# Environmental Protection Series

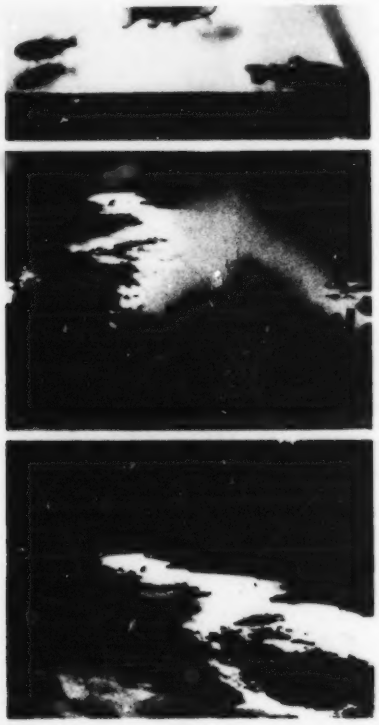
Environment Canada Environnement

Report (Canada. Environment Canada)

No: 1 Date: 900700 RM/13

TD 182 R46
QOFF

2039102F
EXC 1



## Biological Test Method:

## Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to Rainbow Trout

**Reference Method EPS 1/RM/13**
**July 1990**

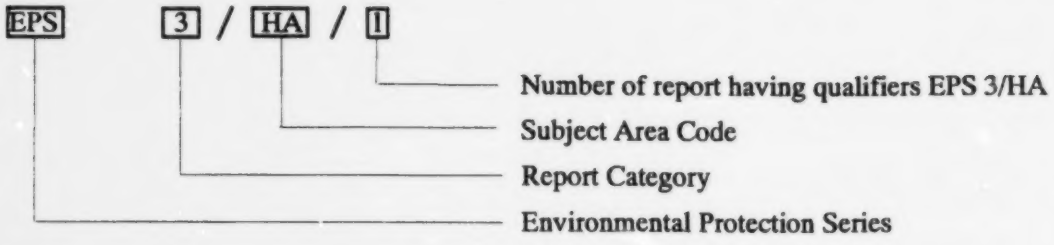
PRINTED IN CANADA

Canada

Environment Canada | Environnement Canada

**ENVIRONMENTAL PROTECTION SERIES**

**Sample Number:**




**Categories**

1 Regulations/Guidelines/Codes of Practice
2 Problem Assessments, and Control Options
3 Research and Technology Development
4 Literature Reviews
5 Surveys
6 Social, Economic and Environmental Impact Assessments
7 Surveillance
8 Policy Proposals & Statements
9 Manuals

**Subject Areas**

AG Agriculture
AN Anaerobic Technology
AP Airborne Pollutants
AT Aquatic Toxicity
CC Commercial Chemicals
CE Consumers and the Environment
CI Chemical Industries
FA Federal Activities
FP Food Processing
HA Hazardous Wastes
IC Inorganic Chemicals
MA Marine Pollution
MM Mining and Ore Processing
NR Northern and Rural Regions
PF Paper and Fibres
PG Power Generation
PN Petroleum and Natural Gas
RA Refrigeration and Air Conditioning
RM Reference Methods
SF Surface Finishing
SP Oil and Chemical Spills
SRM Standard Reference Methods
TS Transportation Systems
TX Textiles
UP Urban Pollution
WP Wood Protection/Preservation

New subject areas and codes are introduced as they become necessary. A list of EPS reports may be obtained from Environmental Protection Publications, Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada, K1A 0H3

*Think Recycling!*

*Pensez à recycler !*

*This publication is printed on paper containing recovered waste.*

# Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to Rainbow Trout

Environmental Protection
Conservation and Protection
Environment Canada

Reference Method EPS 1/RM/13
July 1990

91-02029/

**Canadian Cataloguing in Publication Data**

Main entry under title:

Biological test method. Reference method for determining acute lethality of effluents to rainbow trout

(Reference method ; EPS 1/RM/13)
Text in English and French with French text on inverted pages.
Title on added t.p.: Méthode d'essai biologique, méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë chez la truite arc-en-ciel.
Includes bibliographical references.
ISBN 0-662-57746-9
DSS cat. no. En49-24/1-13

1. Rainbow trout -- Mortality -- Testing -- Standards -- Canada. 2. Rainbow trout -- Microbiology -- Standards -- Canada. 3. Effluent quality -- Testing -- Standards -- Canada. I. Canada. Environmental Protection Directorate. II. Canada. Environment Canada. III. Series: Report (Canada. Environment Canada) ; EPS 1/RM/13. IV. Title. V. Title: Reference method for determining acute lethality of effluents to rainbow trout.

QL638.S2 1990 597.'55 C90-098700-6E

© Minister of Supply and Services Canada 1990
Catalogue No. En 49-24/1-13
ISBN 0-662-57746-9
BEAUREGARD PRINTERS LIMITED

# Readers' Comments

Comments regarding the content of this report should be addressed to:

Gary Sergy
Technology Development Branch
Environment Canada
No. 210, 4999 - 98 Avenue
Edmonton, Alberta
T6B 2X3

Richard Scroggins
Industrial Programs Branch
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Mention of trade names in this document does not constitute endorsement by Environment Canada. Other products of similar value are available.

# Abstract

*Explicit standard or reference methods for measuring the acute lethal toxicity of effluents to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are provided in this report. Specific instructions for performing and reporting acute lethality tests with samples of effluent are given, and the guidance provided in the generic methodology report "Acute Lethality Test Using Rainbow Trout" is built upon (Environment Canada, 1990a).*

*Methods are given for: 1). a single-concentration test, with full-strength effluent unless otherwise specified; 2). a multi-concentration test to determine the median lethal concentration ($LC_{50}$); and 3). a test with a reference toxicant. Instructions are included on holding trout in the laboratory, facilities and water supply, handling and storage of samples, preparation of solutions, test conditions, observations to be made, endpoints with methods of calculation, and the use of reference toxicants.*

# Table of Contents

**Abstract** . . . . . v
**Terminology** . . . . . ix
**Acknowledgements** . . . . . xii

*Section 1*
**Introduction** . . . . . 1

*Section 2*
**Organisms and Holding** . . . . . 2
**2.1** Species and Source . . . . . 2
**2.2** Holding and Acclimation . . . . . 2
**2.3** Water . . . . . 3
**2.4** Physicochemical Conditions . . . . . 3

*Section 3*
**Facilities** . . . . . 4

*Section 4*
**General Procedure for Determining Acute Lethality of Effluent** . . . . . 5
**4.1** Sample Labelling, Transport, and Storage . . . . . 5
**4.2** Test Conditions . . . . . 5
**4.3** Preparing Test Solutions . . . . . 6
**4.4** Beginning the Test . . . . . 6
**4.5** Observations and Measurements . . . . . 7

*Section 5*
**Procedure for Testing a Single Concentration of Effluent** . . . . . 8

*Section 6*
**Procedure for Determining an $LC_{50}$ for Effluent** . . . . . 9

*Section 7*
**Procedure for Tests With a Reference Toxicant** . . . . . 10

*Section 8*
**Reporting Requirements** . . . . . 11
**8.1** Data to be Reported . . . . . 11
**8.1.1** Effluent . . . . . 11
**8.1.2** Test Facilities and Conditions . . . . . 11

**8.1.3 Results** . . . . . **12**
**8.2 Data to be Held on File** . . . . . **12**
**8.2.1 Effluent** . . . . . **12**
**8.2.2 Test Facilities and Conditions** . . . . . **12**
**8.2.3 Results** . . . . . **13**

**References** . . . . . **15**

*Appendix*
**List of Members of the Inter-Governmental Aquatic Toxicity Group and Conservation & Protection Regional and Headquarters' Office Addresses** . . . . . **17**

# Terminology

The following definitions are given in the context of this report, and additional definitions in the detailed companion document (Environment Canada, 1990a) apply here.

*Acclimation* means to become physiologically adapted to a particular level of one or more environmental variables such as temperature. The term usually refers to controlled laboratory conditions.

*Acute* means happening within a short period of time, usually taken as ≤ 96-h for fish.

*Alevin* is a recently-hatched, non-feeding fish with an evident yolk sac (for nutritive requirements). Often referred to as yolk-sac fry.

*Conductivity* is a numerical expression of the ability of an aqueous solution to carry electric current. This depends on concentrations of ions in solution, their valence and mobility, and on temperature. Conductivity is reported as millisiemens/metre, an SI unit (Système international d'unités), or as micromhos/cm (1 mS/m = 10 μmhos/cm).

*Control* is a treatment in an investigation that duplicates all the factors that might affect results, except the specific condition being studied. In toxicity tests, the control must duplicate all conditions in the exposure treatment(s), but must contain no test material. The control is used to check for toxicity due to basic conditions such as quality of dilution water, or health and handling of organisms.

*Control/dilution* water is the water used for diluting the sample of effluent, or for the control test, or both.

*Dechlorinated* water is a chlorinated water (usually municipal drinking water) that has been treated to remove chlorine.

*Dilution* water is that which is used to dilute a test material, to prepare different concentrations for the toxicity test.

*Effluent* is any liquid waste (e.g., industrial, municipal) discharged to the aquatic environment.

*Fingerling* is a young (underyearling), actively feeding fish.

*Flow-through* describes tests in which solutions in test vessels are renewed continuously by the constant inflow of a fresh solution, or by a frequent intermittent inflow.

*Fork length* is the length of a fish, as measured from the tip of the nose to the fork of the tail.

*Hardness* is used to mean Total Hardness, the sum of calcium and magnesium concentrations, both expressed as calcium carbonate in milligrams per litre (mg/L).

$LC_{50}$ (median lethal concentration) is the concentration of material (in this case effluent) in water that is estimated to be lethal to 50% of test organisms after a defined period of exposure (e.g., 96-h $LC_{50}$).

*Lethal* means causing death by direct action. Death of fish is defined here as the cessation of all visible signs of movement or other activity.

*Lux* is a unit of illumination based on units per square metre. One lux = 0.0929 foot-candles and one foot-candle = 10.76 lux.

*Overt* means obviously discernible under the test conditions employed.

*pH* is the negative logarithm of the activity of hydrogen ions in gram equivalents per litre. The pH value expresses the degree or intensity of both acidic and alkaline reactions on a scale from 0 to 14, with 7 representing neutrality, numbers less than 7 signifying increasingly greater acidic reactions, and numbers greater than 7 indicating increasingly basic or alkaline reactions.

*Photoperiod* is the duration of illumination and darkness within a 24-h day.

*Pre-treatment* means, in this report, treatment of a sample or dilution thereof, prior to exposure of fish.

*Reference toxicant* is a standard chemical used to assess the sensitivity of organisms and the validity of measurements of effluent toxicity.

*Salinity* is the total amount of solid material, in grams, dissolved in 1 kg of seawater. It is determined after all carbonates have been converted to oxides, all bromide and iodide have been replaced by chloride, and all organic matter has been oxidized. Salinity can also be measured directly using a salinity/conductivity meter or other means (see APHA *et al.*, 1989). It is usually reported in parts per thousand (‰).

*Static* describes toxicity tests in which solutions are not renewed during the test.

*Static replacement* describes toxicity tests in which solutions are renewed (replaced) periodically during the test, usually every 24 h. Synonymous terms are "renewal", "batch replacement", and "semi- static".

*Sublethal* means detrimental to an organism, but below the level which directly causes death within the test period.

*Swim-up fry* is a young, post-alevin fish which has commenced active feeding.

*Toxicity* means the inherent potential or capacity of a material to cause adverse effects in living organisms.

# Acknowledgements

This report was shaped by the objectives, needs, and comments of members of a subcommittee from Environmental Protection (EP): N. Bermingham (EP, Montreal); C. Blaise (EP, Longueuil); G. Coulombe (EP, Montreal); K. Doe (EP, Dartmouth); G. Elliott (EP, Edmonton); D. MacGregor (EP, Ottawa); J. MacLatchy (EP, Ottawa); W. Parker (EP, Dartmouth); D. Robinson (Fisheries & Oceans Canada, Ottawa); T. Ruthman (EP, Ottawa); R. Scroggins (EP, Ottawa); G. Sergy (EP, Edmonton); and R. Watts (EP, North Vancouver). Special thanks to provincial members of the Inter-Governmental Aquatic Toxicity Group (G. Joubert, ministère de l'Environnement du Québec; G. Westlake, Ontario Ministry of Environment; W. Young, Manitoba Environment and Public Safety; K. Lauten, Saskatchewan Environment and Public Safety; J. Somers, Alberta Environment; S. Horvath and G. van Aggelen, B.C. Ministry of Environment) who provided valuable input and comment. The contributions of the following external reviewers are acknowledged with sincere thanks: D. Vaughan (EP, Dartmouth); S. Wade (EP, Dartmouth); A. Beckett (EP, Edmonton); F. Zaal (EP, Edmonton); S. Yee (EP, North Vancouver); D. Moul (EP, North Vancouver); V. Zitko (Fisheries & Oceans Canada, St. Andrews); V. Cairns (Fisheries & Oceans Canada, Burlington); S. Samis (Fisheries & Oceans Canada, Vancouver); R. Martin (Newfoundland Dept. Environ. & Lands, St. John's); J. Lee (Ontario Ministry of Environment, Rexdale); J. Moores (Alberta Environment, Vegreville); P. Martel (Pulp & Paper Research Inst. of Canada, Pointe Claire); Y. Bois (Technitrol · Eco Inc., Pointe Claire); C.R. Cook (E.B. Eddy Forest Products Ltd., Espanola); G. Craig (Beak Consultants Ltd., Brampton); and D. Bradley, D. Monteith, and J. Pickard (B.C. Research Corp., Vancouver). The laboratory testing support of Environment Canada (see Appendix) is also acknowledged.

Messrs. R. Scroggins and G. Sergy (EP, Environment Canada) acted as Scientific Authorities and provided technical input and guidance. The document was prepared by Don McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, B.C.) and John Sprague (J.B. Sprague Associates Ltd., Guelph, Ontario).

*Section 1*

# Introduction

The procedures for an acute lethality test with rainbow trout, specified by the Canadian government in pollution control regulations for various categories of industry, are given in this report. Rainbow trout have been used for two decades in Canada for testing effluents under a series of regulations and guidelines (EPS, 1971; 1973; 1974; 1977a-c; 1984). An existing standard procedure (EPS, 1980) provided the foundation for the present method, which should be used in conjunction with a more extensive report which gives supporting rationale and additional details (Environment Canada, 1990a).

Many components of procedures in this report are similar to Canadian provincial methods (McGuinness, 1982; Rocchini *et al.*, 1982; Craig *et al.*, 1983; OME, 1989), methods used in the United States (ASTM, 1980; U.S. EPA, 1985a; U.S. EPA, 1985b; APHA *et al.*, 1989), or international techniques (BHSC, 1982; UKWRC, 1983; OECD, 1984). The contribution of the above-mentioned methods to all parts of the present report is acknowledged, and they are recommended as sources of supporting information. Procedures stipulated in this report should, however, be taken as the definitive ones for regulatory purposes.

The organism to be tested is the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (formerly *Salmo gairdneri*), native to western North America but now inhabiting waters of all Canadian provinces and widely introduced around the world. It thrives in cool, fresh water, runs to sea on both Atlantic and Pacific coasts, and is commonly reared in hatcheries and commercial aquaculture. It has also become the world's standard cool-water fish for freshwater toxicity tests, with a toxicological data bank of appreciable magnitude.

Three basic procedures are described. One uses a single concentration of effluent (full strength unless otherwise specified) and a control, as would be suitable for a pass/fail test. A second procedure estimates the median lethal concentration ($LC_{50}$) (i.e., it determines the degree of toxicity using several concentrations of effluent including full strength). A third procedure is a multi-concentration test with a reference toxicant, to assess the sensitivity of the test fish to a standard toxicant and the precision of the data produced by the laboratory.

This test is to be used with effluents containing fresh water or having a salinity of $\leq$ 10 ‰, defined as conductivity $\leq$ 1400 mS/m at a temperature of 15 °C. Saline (> 10 ‰) effluents discharging into fresh water should also be tested with rainbow trout acclimated to fresh water. Saline effluents discharging directly to seawater should be tested with a species authorized by the regional Environment Canada laboratory (see Appendix) and acclimated to seawater of similar salinity to that of the effluent.

*Section 2*

# Organisms and Holding

## *2.1 Species and Source*

Test fish are to be rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), either swim-up fry that have been actively feeding for at least two weeks, or fingerlings. Their average wet weight should be between 0.3 and 5 g, and the largest fish should not be more than twice the length of the smallest in the same test.

Fish may be acquired as eyed eggs, fry, or fingerlings, all from the same hatchery and stock and free of known diseases. Procurement and shipment of fish should be approved by regional representatives of the Federal (Fisheries and Oceans Canada) - Provincial Transplant Committee, in provinces where this committee acts to control movements of fish stocks. Advice on sources of trout can be obtained from regional offices of Environment Canada (see Appendix).

## *2.2 Holding and Acclimation*

Fish should be reared using tanks and other facilities made of nontoxic materials such as stainless steel, porcelain, fiberglass-reinforced polyester, acrylic, polyethylene, or polypropylene. Eggs and alevins may be incubated in vertical-flow hatchery trays or flowing water troughs (Leitritz and Lewis, 1976). Fry and fingerlings may be reared and acclimated in troughs or tanks with flowing water, located away from physical disturbances and preferably separate from the test tanks.

Rearing may be done outdoors, but two and preferably three or more weeks of acclimation to the lighting and temperature to be used in tests (see Section 2.4) are required. This may be done indoors or outdoors using lids with photoperiod-controlled lights. See Environment Canada (1990a) for additional details on holding and acclimating fish for use in toxicity tests.

Tanks should be kept clean, with siphoning of excess food and faeces as frequently as necessary. Tanks with central, double standpipes are partially self-cleaning and are recommended. Tanks should be disinfected and rinsed thoroughly with water used for holding/acclimating fish before introducing a new batch of fish. Disinfectants such as those containing chlorinated or iodophore compounds or n-alkyldimethyl-benzylammonium chloride should be used.

Unless specified otherwise by the feed manufacturer, feeding should be once or more per day with a recognized (standard) commercial pelleted fish food, at a daily ration approximating 1 to 5% of wet body weight, depending on temperature and fish size (Environment Canada, 1990a). Pellet size and type should be chosen in consideration of fish size and age, water temperature, and the manufacturer's recommendations. The duration and method of food storage should also follow the manufacturer's recommendation.

Dead and moribund fish should be removed immediately after daily inspection.

Mortalities in the stock tank(s) from which test fish are to be taken should be less than 2% during the seven days before a test. If mortality is 2 to 10%, acclimation should be extended for at least seven days until a mortality of ≤ 2% is achieved in a seven-day period. Mortalities > 10% per week make the group of fish unacceptable for future use if deaths are caused by disease or aquatic contaminants. If deaths result from other factors (e.g., high initial mortalities during transition from alevins to swim-up fry or following fish transfer), the fish may be used for future toxicity tests provided that mortalities in the stock tank(s) from which fish are to be taken decline to < 2% during the seven days immediately preceding a test. Chemical treatment of diseased fish should be avoided, and if treated they must not be used in toxicity tests for at least four weeks. The test with a reference toxicant (see Section 7) gives some indication of suitability of the fish for toxicity tests.

## *2.3 Water*

Water for holding and acclimating fish can be uncontaminated ground- , surface, or dechlorinated municipal water. The water should consistently support good survival, health, and growth of trout. Chemical quality of the laboratory supply should be measured as often as necessary to document variation. This should include at least hardness, pH, conductivity, dissolved oxygen, and residual chlorine (if municipal water is used), and if possible, alkalinity, suspended solids, total organic carbon, total dissolved gases, ammonia, nitrite, metals, and total organophosphorus pesticides. Any supersaturation with gases should be remedied (see Environment Canada, 1990a).

If municipal water is used, it must be free of any harmful concentration of chlorine upon fish exposure. The target value for total residual chlorine in holding tanks, and for that in control/dilution water within test tanks, is ≤ 0.002 mg/L (see Environment Canada, 1990a).

Flow of fresh (new) water through tanks used for holding and acclimating fish must be ≥ 1.0 L/min for every kilogram of fish being held (1.4 L/g fish·$d^{-1}$ or 0.69 g fish· d/L). In addition, a tank must contain at any given time, ≥ 1.0 L/10 g of fish. Under unusual circumstances, cleaning and recirculation of water may be permissible (Environment Canada, 1990a).

## *2.4 Physicochemical Conditions*

Lighting should be by overhead full-spectrum fluorescent lights, with intensity at the water surface ≤ 500 lux. For at least two weeks before a test, photoperiod must be constant at 16 ± 1 h of light and 8 ± 1 h of darkness, preferably with a 15- to 30-min. transition period.

Holding temperature may be 4 to 18 °C, but fish must be acclimated for ≥ 2 weeks, and preferably ≥ 3 weeks, at 15 ± 2 °C before use in a test. Change between temperature levels may proceed at ≤ 3 °C/d. Dissolved oxygen within tanks should be 80 to 100% air saturation. Supplementary aeration using filtered, oil-free compressed air, should be provided if necessary. The pH of water should be within the range 6.0 to 8.5. Temperature, oxygen, pH, flow, and fish mortalities should be monitored for each holding or acclimation tank, preferably daily; weekly or more frequent monitoring of levels of ammonia, nitrite, and total residual chlorine (if municipal water source) in holding or acclimation tanks is recommended.

*Section 3*

# Facilities

Tests must be performed in a facility isolated from general laboratory disturbances, either a separate room or a section walled or curtained off. Dust and fumes should be minimized. Control of test temperature ($15 \pm 1$°C) may be achieved by thermostatically-controlled air conditioning or by immersing test vessels in regulated water baths.

Test vessels and all other material and equipment that may contact the test solutions or control/dilution water must not contain leachable substances, nor should they sorb toxicants from the test solution. Test vessels must be glass or Plexiglas™, acrylic, polypropylene, polyethylene, or have polyethylene liners. If liners are used, they must be discarded at the end of the test. It is recommended that test vessels be covered (Environment Canada, 1990a). All containers for a test should be identical, and the minimum water depth must be 15 cm. Equipment must be thoroughly cleaned and rinsed in accordance with good laboratory procedures.

The control/dilution water should be the type described in Section 2.3, and it should preferably be identical to that used for holding and/or acclimating the fish.

*Section 4*

# General Procedure For Determining Acute Lethality of Effluent

## *4.1 Sample Labelling, Transport, and Storage*

Sample-volume requirements depend on fish size and numbers per test solution, loading-density requirements, test concentrations, and the use of replicates. For single-concentration tests, sample volumes of 25 to 50 L or more are normally required. For tests to determine an $LC_{50}$, sample volumes of 50 to 100 L or more are normally required.

Containers for storage and transportation of samples must be of nontoxic material (e.g., polyethylene or polypropylene carboys or pails). The containers must be new or thoroughly cleaned and dried, and should be rinsed with clean water, then with the sample to be collected. They should be filled with sample to exclude air and then be sealed. Labelling must include at least sample type, source, date and time of collection, and name of sampler(s).

Samples should be kept from freezing. During transport, samples should be kept dark, and at a temperature of 1 to 8 °C if more than two days are spent in transit. Upon arrival at the laboratory, samples may be adjusted immediately or overnight to 15 °C, then testing commenced. If stored at the test facility, samples must be kept dark and cool (8 °C or less, preferably 4 ± 2 °C).

Testing of samples should commence as soon as possible after collection. The test should begin within three days and must commence no later than five days after termination of sampling. Samples must be agitated thoroughly just before pouring aliquots to prepare solutions. Sub-samples (a sample divided between two or more containers) must be combined.

## *4.2 Test Conditions*

This is a 96-h static test, i.e., there is no replacement of solutions. Loading of fish into each test vessel should not exceed a density of 0.5 $g/L \cdot d^{-1}$ over four days (i.e., $\geq 2\ L/g \cdot 4d^{-1}$; $\geq 0.5\ L/g \cdot d^{-1}$). Fish are not fed during the test, nor during the 24-h period immediately preceding it. The test is not valid if > 10% of control fish die or exhibit atypical/stressed behaviour (Environment Canada, 1990a).

The test must be conducted at 15 ± 1 °C. All solutions are aerated throughout the test. Lighting must be the same as that defined for acclimation (see Section 2.4). Photoperiod (a light : dark cycle of 16 ± 1 h : 8 ± 1 h) must coincide with the timing which prevailed during acclimation.

The test must be conducted without adjustment of sample or solution pH. However, if it is desired to understand the extent to which extremes in solution or sample pH (e.g., outside the range 5.5 to 8.5) may contribute to acute lethality, a parallel (pH-adjusted) test may be used. If both pH-adjusted and non-adjusted tests are run, definitive results should be those derived from the non-adjusted test. Rationale and

procedural details regarding pH adjustment are provided in Environment Canada (1990a). Adjustment of pH is also one of a number of "Toxicity Identification Evaluation" techniques for characterizing the cause of sample toxicity (Mount and Anderson-Carnahan, 1988).

## *4.3 Preparing Test Solutions*

Adjustment of the effluent sample and control/dilution water to $15 \pm 1°$ C must be done if temperature is outside that range.

For a given test, the same water is to be used for preparing the control(s) and all test concentrations less than 100%. This is almost always the same water as used for acclimation. If temperature of this water is adjusted upwards, supersaturation with gases must be avoided. The water must have an oxygen content within the range of 90 to 100% air-saturation, achieved if necessary by vigorous aeration with oil-free compressed air passed through air stones or glass diffusers.

Test vessels should be rinsed with control/dilution water just before use, although that is not necessary if disposable polyethylene liners are used. Test solutions must be made up and well mixed with a glass rod, Teflon™ stir bar, or other non-reactive device, just before their use. All test vessels, measurement devices, stirring equipment and fish-transfer pails must be thoroughly cleaned and rinsed in accordance with standard operational procedures.

Upon preparation of the test solutions, each should be aerated for a period of 30 minutes at a rate $\leq 7.5$ mL/min $\cdot L^{-1}$. Thereafter, the concentration of dissolved oxygen must be measured in at least the highest test concentration (normally 100% effluent). If (and only if) oxygen in the highest test concentration is <70% or >100% of air saturation, then pre-aeration (i.e., before exposure of fish) of all solutions including the control(s) must be continued at $\leq 7.5$ mL/min $\cdot L^{-1}$. This period of pre-aeration must be restricted to the lesser of 90 minutes and attaining 70% saturation in the highest test concentration (or 100% saturation if supersaturation is evident). Immediately thereafter, fish must be placed in each test solution and the test initiated, regardless of whether 70 to 100% saturation was achieved in all test solutions. Aeration of test solutions should be provided by bubbling compressed air through a clean silica-glass air diffuser or disposable glass pipette (Environment Canada, 1990a). Bubble size should be in the range of 1 to 3 mm.

## *4.4 Beginning the Test*

Each test vessel must be clearly coded or labelled as to concentration, date, and time of start. Vessels should be positioned for easy observation of fish, and the concentrations should preferably be positioned at random. Aeration of each test solution at a rate no greater than 7.5 mL/min $\cdot L^{-1}$ should be continued throughout the test, using one of the air diffusers specified in Section 4.3.

If one or more test solutions are highly coloured, opaque or foamy, baskets made of nontoxic, nonabrasive material (e.g., nylon, polyethylene, polypropylene) may be used to permit inspections of fish during the test. If used, a basket should be placed in each test vessel including the control(s). Baskets should be big enough to permit fish movement throughout the test vessel. Each basket must be thoroughly cleaned and

rinsed with control/dilution water before being used.

Equal numbers of fish are to be introduced into each test solution including the control(s). At least ten fish should be used per treatment. They may be divided between two or more vessels at the same concentration to meet the required limit on loading. The order of adding fish to vessels should be randomized beforehand. Individual fish are to be used only once, and handling methods should minimize stress (Environment Canada, 1990a).

## *4.5 Observations and Measurements*

Colour, turbidity, odour, and floating or settling solids in the sample should be noted at the start of the test. The appearance of test solutions should also be noted, and any obvious changes during the test should be recorded.

Measurements of dissolved oxygen and pH must be made in each test solution including the control(s), at the start and end of the test as a minimum. Final measurements should be done after biological observations are complete. Conductivity of each test solution should be measured at the start of the test as a minimum. Temperature should be measured in representative solutions, daily.

Each vessel should be inspected at least at 24, 48, 72, and 96 h, and dead fish recorded and removed. Fish are considered to be dead when they fail to show evidence of opercular or other activity, and do not respond to subsequent gentle prodding. Overt sublethal toxic effects should also be recorded (see Environment Canada, 1990a). For highly-coloured, opaque, or foamy test solutions, fish may be inspected using a dip net (cleaned and rinsed before use) or by raising them to the surface within a suitable basket (Section 4.4). Mean (± SD) fork lengths and wet weights of control fish should be determined at the end of the test.

*Section 5*

# Procedure for Testing a Single Concentration of Effluent

All conditions, procedures, and facilities specified in Sections 1, 2, 3, 4, 7 and 8 apply to the procedure for testing a single concentration of effluent.

This procedure uses one concentration of effluent, 100% unless otherwise specified, plus a control. Replicate solutions may be tested but are not required. At least ten fish should be exposed to each solution of effluent and control. The test is invalidated if >10% of the control fish exhibit atypical/stressed behaviour and/or mortality.

The end point for this test is percentage mortality at 96 h. Mortality of 50% is commonly used, and is associated with greater precision of measurement than percentages such as 20% or 80% which are closer to the extremes of the distribution of effects. For example, the 1990 proposed Pulp and Paper Effluent Regulations of Environment Canada (1990b) define an effluent as failing this test if the effluent at 100 % concentration kills 50 % or more of the fish.

*Section 6*

# Procedure for Determining an $LC_{50}$ for Effluent

All conditions, procedures, and facilities specified in Sections 1, 2, 3, 4, 7 and 8 apply to this procedure.

At least five concentrations of effluent plus a control (dilution water only) must be used in tests to estimate an $LC_{50}$. The highest concentration must be full-strength effluent, and each successive concentration must have at least 50% of the strength of the next higher one. A geometric (logarithmic) series is beneficial (e.g., percentage concentrations such as 100, 50, 25, 12.5, 6.3). Concentrations may be based on other proportions or on standard dilution series (see Appendix D of Environment Canada, 1990a).

Replicates of each concentration may be used but are not required. If replicates are used, their data are combined for calculating the $LC_{50}$. The precision of the estimate of $LC_{50}$ increases with the number of organisms used, but not necessarily its accuracy.

The 96-h $LC_{50}$ and its 95% confidence limits should be calculated and the method of calculation reported. Computer programs for calculating $LC_{50}$ and confidence limits are available (Environment Canada, 1990a) and should be used. A recommended program is available for copying onto a user-supplied disk through courtesy of C.E. Stephan (Stephan, 1977), from Environment Canada (address in Appendix). A check of the computer-derived $LC_{50}$ should be made by examining a plot on logarithmic-probability scales, of percent mortalities at 96 h for the various effluent concentrations (see Environment Canada, 1990a).

The test is invalidated if >10% of the control fish (combined data if replicates are used) exhibit atypical/stressed behaviour and/or mortality.

*Section 7*

# Procedure for Tests With a Reference Toxicant

A reference toxicant must be used to assess the relative sensitivity of test fish and the precision of data produced by the laboratory. The selected chemical(s) must be tested at least once during each calendar month when an effluent is tested, and upon acclimation of a new batch of fish. The procedures and conditions to be followed are identical to those in Section 4 and as described in Environment Canada (1990a, c), except that a reference chemical is measured out and tested, instead of an effluent. The control/dilution water used routinely in effluent tests should also be used for the reference toxicant.

Reagent-grade phenol and/or zinc sulphate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) are recommended for use as reference toxicants. The 96-h $LC_{50}$ should be determined for the reference toxicant(s) used and expressed as mg/L based on phenol or zinc ($Zn^{++}$) (see Environment Canada, 1990a). Stock solutions of phenol must be made up on the day of use, and those for zinc should be prepared fresh on the day of use or stored in the dark at pH 3 to 4.

Concentrations of reference toxicant in all stock solutions should be measured chemically by appropriate methods (APHA *et al.*, 1989). Upon preparation of the test solutions, aliquots are to be taken from at least the control, low, middle, and high concentrations, and analyzed directly or stored for future analysis should the $LC_{50}$ be atypical (outside warning limits). If stored, sample aliquots must be held in the dark at $4 \pm 2$ °C. Both zinc and phenol aliquots should be preserved (APHA *et al.*, 1989) before storage. Stored aliquots requiring chemical measurement should be analyzed promptly upon completion of the toxicity test. It is desirable, but not required, to measure concentrations in the same solutions at the end of the test after completing biological observations. Calculations of $LC_{50}$ should be based on measured concentrations if they are appreciably (i.e., $\geq 20\%$) different from nominal ones.

A warning chart (U.S. EPA, 1985a; Environment Canada, 1990c) or similar record must be prepared for each reference toxicant used, and continually updated. Successive $LC_{50}$s are plotted to determine whether they are within $\pm 2$ SD of the geometric mean (or arithmetic mean, in those instances where data are not normally distributed) of previous $LC_{50}$s. The geometric mean with its upper and lower warning limits ($\pm 2$ SD, still calculated on a logarithmic basis) is recalculated with each successive $LC_{50}$ until the statistics stabilize (U.S. EPA, 1985a; Environment Canada, 1990c). If a particular $LC_{50}$ falls outside the warning limits, sensitivity of the fish and validity of recent effluent tests are both suspect. A check of all acclimation and test conditions is required under these circumstances. Depending on the findings, further acclimation and re-evaluation of the fish with one or more reference toxicants should be undertaken, or a new population of fish should be procured and acclimated for use in toxicity tests.

*Section 8*

# Reporting Requirements

The following is a summary of reporting and record-keeping requirements associated with this reference method. Further details or explanation can be found within previous sections of this method.

Unless otherwise specified by Environment Canada, all items listed in Section 8.1 must be reported to Environment Canada for each completed toxicity test. The information is to be provided in accordance with pertinent regulations, and in a manner and format specified by Environment Canada* (i.e., manual or electronic; transmission mode; form and content).

Information additional to that in Section 8.1, such as that required by or distinctive to a regulation, or that which is necessary to clarify reporting and data assessment, may also be specified by Environment Canada.

Unless otherwise specified by Environment Canada, those items listed under Section 8.2 must be recorded and held on file for a period of five years. This information is to be provided as and when requested by Environment Canada. It will be required on a less frequent basis such as during an audit or investigation.

## *8.1 Data to be Reported*

### *8.1.1 Effluent*

- name and location of operation generating the effluent;
- date and time of sampling;
- type of sample (e.g. "whole effluent from plant", "final mill effluent", "discharge from emergency spill lagoon", "leachate");
- brief description of sampling point;
- sampling method (e.g., "grab", "batch", "24-h composite with sub-samples at 1-h intervals");
- person collecting sample; and
- indication if sample frozen or partially frozen in transit.

### *8.1.2 Test Facilities and Conditions*

- test type and protocol (e.g., "single-concentration test", protocol specified in Reference Method "EPS 1/RM/13";
- indication of any differences from method given in this report;
- name and city of testing laboratory;

*Contact an office listed in the Appendix for details.

- species of test organism;
- date and time for start of definitive test;
- persons performing the test and verifying the results;
- the pH, temperature, dissolved oxygen, and conductivity of unadjusted, undiluted effluent, just before preparing test solutions;
- indication of aeration of test solutions (rate, time) before introduction of fish; method and rate of aeration throughout the test;
- concentrations and volumes tested, including controls, and indication of replication;
- measurements of dissolved oxygen, pH, temperature, and conductivity determined for each test solution (including control(s)) during the test; and
- number of fish per vessel; mean (± SD) wet weight and loading density (g/L) of fish in test solutions.

#### *8.1.3 Results*

- number of mortalities of fish in each test solution (including control(s)) at 96 h; number of control fish showing atypical/stressed behaviour;
- estimate of 96-h $LC_{50}$ and 95% confidence limits in multi-concentration tests, by computer calculation; indication of statistical method (e.g., log-probit, moving average) on which result is based; and
- most recent 96-h $LC_{50}$ (with 95% confidence limits) for reference toxicant(s); chemical(s), date test initiated; historic geometric mean $LC_{50}$ and warning limits (± 2 SD).

### *8.2 Data to be Held on File**

#### *8.2.1 Effluent*

- detailed description of sampling point, source and type of effluent;
- type of container(s) and label or code used;
- volume and/or weight of sample;
- transport and storage conditions (times, temperatures);
- appearance and other properties (observations on colour, turbidity, odour, floating or settleable material);
- colour change, precipitation, flocculation, release of volatiles or other changes when making up test solution(s); and
- procedures and results for any chemical analyses (e.g., suspended solids content, hardness).

#### *8.2.2 Test Facilities and Conditions*

- address of testing laboratory;
- description of rearing/acclimation and test facilities including general layout of each and means of isolation;
- normal holding and acclimating conditions (containers, location, lighting, temperatures including maximum rate of change, aeration, volumes and flows of water, method of water renewal, numbers

---

* To be stored for a five-year period at the test facility and/or the offices of the discharger. Some of this information may be comon to a series of tests, and recorded and held on file as a general report.

and densities of fish, handling methods, food type, ration and frequency of feeding, disease incidence and treatment if any, weekly percent mortality);

- source of test fish;
- brief history of test-specific conditions and procedures for holding and acclimating fish (e.g., times, water source, and characteristics such as temperature, pH and dissolved oxygen content, food type and ration, disease incidence and treatment, weekly percent mortality) if different from usual practice;
- description of source(s) of water used for rearing and acclimating fish and as control/dilution water;
- pre-treatment of acclimation/control/dilution water, if any (e.g., adjustment of temperature, aeration rate and duration, quantity of any chemical added);
- quality (mean and range values) of acclimation and control/dilution water as measured for source water and within holding tank(s); to include hardness, pH, conductivity, dissolved oxygen content, and total residual chlorine (if municipal water); preferably also total dissolved gases, alkalinity, solids, organic carbon, colour, mineral ions, metals, ammonia, nitrite, and organophosphorus pesticides;
- systems to regulate light and temperature;
- light source, photoperiod, and past measures of intensity at rearing/acclimation tanks and at surface of test vessels;
- description of test vessels (size, shape, and material), covers and baskets (if used for inspecting fish), and routine cleaning procedures for each;
- conditions and apparatus for aeration of test solutions;
- fork length and wet weight of fish used in test (means and standard deviations, sample size);
- appearance of solutions; any changes during test;
- test concentrations of reference toxicant(s), both nominal and measured; indication of data set used to estimate $LC_{50}$; and
- any measurements of water quality in test solutions not included in data reported (Section 8.1.2).

### *8.2.3 Results*

- any observations of mortalities of fish not included in data reported (e.g., at 24, 48, and 72 h) (see Section 8.1.3);
- observations of fish behaviour and appearance recorded for each test solution during the test; and
- confirmation that graph verified any computer-derived $LC_{50}$(s).

# References


APHA *et al.*, "Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms", p. 8-1 – 8-143 in: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th ed. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, Washington, D.C., Part 8000, (1989).

ASTM, "Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians", Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, PA, Report E729-80, 25 p. (1980).

BHSC, "Methods for the Determination of Ecotoxicity", Approved Code of Practice, Notification of New Substances Regulations 1982, British Health and Safety Commission, London, U.K., Report COP 8, 13 p. (1982).

Craig, G.R., K. Flood, J. Lee, and M. Thomson, "Protocol to Determine the Acute Lethality of Liquid Effluents to Fish", Ontario Ministry of Environment, Rexdale, Ontario, 9 p. (1983).

Environment Canada, "Acute Lethality Test Using Rainbow Trout", Conservation and Protection, Ottawa, Ontario, Report EPS 1/RM/9 (1990a).

Environment Canada, 1990 proposed "Pulp and Paper Regulations", (1990b).

Environment Canada, "Guidance Document for Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants", Conservation and Protection, Ottawa, Ontario, Report EPS 1/RM/12 (1990c).

EPS, "Pulp and Paper Effluent Regulations", Environ. Prot. Serv., Environment Canada, Regulations, Codes and Protocols, Ottawa, Ontario, Report EPS 1-WP-72-1 (1971).

EPS, "Guidelines on the Use and Acceptability of Oil Spill Dispersants", Environ. Prot. Serv., Environment Canada, Report EPS 1-EE-73-1, Ottawa, Ontario ( August, 1973).

EPS, "Petroleum Refinery Effluent Regulations and Guidelines", Environ. Prot. Serv., Environment Canada, Regulations, Codes and Protocols, Ottawa, Ontario, Report EPS 1-WP-74-1 (1974).

EPS, "Metal Mining Liquid Effluent Regulations and Guidelines", Environ. Prot. Serv., Environment Canada, Regulations, Codes and Protocols, Ottawa, Ontario, Report EPS 1-WP-77-1, (1977a).

EPS, "Meat and Poultry Products Plant Liquid Effluent Regulations and Guidelines", Environ. Prot. Serv., Environment Canada, Regulations, Codes and Protocols, Ottawa, Ontario, Report EPS 1-WP-77-2 (1977b).

EPS, "Potato Processing Plant Liquid Effluent Regulations and Guidelines", Environ. Prot. Serv., Environment Canada, Regulations, Codes and Protocols, Ottawa, Ontario, Report EPS 1-WP-77-4 (1977c).

EPS, "Standard Procedure for Testing the Acute Lethality of Liquid Effluents", Environ. Prot. Serv., Environment Canada, Regulations, Codes and Protocols, Ottawa, Ontario, Report EPS 1-WP-80-1 (1980).

EPS, "Guidelines on the Use and Acceptability of Oil Spill Dispersants", Environ. Prot. Serv., Environment Canada, Regulations, Codes and Protocols, Ottawa, Ontario, Report EPS 1-EP-84-1 (1984).

Leitritz, E. and R.C. Lewis, "Trout and Salmon Culture (Hatchery Methods)", University of California, CA, Fish Bulletin No. 164, 197 p. (1976).

McGuinness, E.J., "Procedures Manual, Aquatic Bioassay Service Projects", Alberta Environmental Centre, Vegreville, Alberta, Report AECV-82M1, 56 p. (1982).

Mount, D.I. and L. Anderson-Carnahan, "Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures", U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, Report EPA-600/3-88/034 (1988).

OECD, "Guideline for Testing of Chemicals - Fish, Acute Toxicity Test", Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, Document No. 203, 12 p. (1984).

OME, "Protocol for Single Concentration Acute Lethality Tests on Liquid Effluent Samples Using Rainbow Trout", Ontario Ministry of Environment, Rexdale, Ontario, 10 p. (1989).

Rocchini, R.J., M.J.R. Clark, A.J. Jordan, S. Horvath, D.J. McLeay, J.A. Servizi, A. Sholund, H.J. Singleton, R.G. Watts and R.H. Young, "Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish", B.C. Ministry of Environment, Victoria, B.C., 18 p. (1982).

Stephan, C.E., "Methods for Calculating an $LC_{50}$", p. 65-84 in: *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, F.L. Mayer and J.L. Hamelink (eds.), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, PA, ASTM STP 634 (1977).

UKWRC, "Acute Toxicity to Fish. Determination of the 96-hour $LC_{50}$ of Test Substances to the Rainbow Trout Under Flow-through Conditions", Water Research Centre, Great Britain, Medmenham, U.K., Standard Operating Procedure, No. EP 120 02, 19 p. (1983).

U.S. EPA, "Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms", W.H. Peltier and C.I. Weber (eds.), U.S. Environmental Protection Agency, Report EPA/600/4-85/013, Cincinnati, OH (1985a).

U.S. EPA, "Acute Toxicity Test for Freshwater Fish; Standard Evaluation Procedure", U.S. Environmental Protection Agency, Hazard Evaluation Division, Washington, DC, Report EPA-540/9-85-006, 12 p. (1985b).

*Appendix*

# List of Members of the Inter-Governmental Aquatic Toxicity Group and Conservation & Protection Regional and Headquarters' Office Addresses

## Members of the Inter-Governmental Aquatic Toxicity Group*

***Federal*****

P. Wells (Chairperson)
EP, Dartmouth, Nova Scotia

B. Moores
St. John's, Newfoundland

K. Doe
Dartmouth, Nova Scotia

W. Parker
Dartmouth, Nova Scotia

N. Bermingham
Longueuil, Québec

C. Blaise
Longueuil, Québec

G. Elliott
Edmonton, Alberta

R. Watts
North Vancouver, British Columbia

K. Day
National Water Research Institute
Burlington, Ontario

B. Dutka
National Water Research Institute
Burlington, Ontario

C. Kriz
Federal Programs Branch
Ottawa, Ontario

D. MacGregor
Commercial Chemicals Branch
Ottawa, Ontario

P. MacQuarrie
Commercial Chemicals Branch
Ottawa, Ontario

R. Scroggins
Industrial Programs Branch
Ottawa, Ontario

G. Sergy
Technology Development Branch
Edmonton, Alberta

P. Farrington
Water Quality Branch
Ottawa, Ontario

***Provincial***

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Sainte Foy, Québec

G. Westlake
Ontario Ministry of Environment
Rexdale, Ontario

W. Young
Manitoba Environment and Public Safety
Winnipeg, Manitoba

K. Lauten
Saskatchewan Environment and Public Safety
Regina, Saskatchewan

J. Somers
Alberta Environment
Vegreville, Alberta

S. Horvath
B.C. Ministry of Environment
Vancouver, British Columbia

G. van Aggelen
B.C. Ministry of Environment
North Vancouver, British Columbia

---

* IGATG membership as of July 1990
** Conservation and Protection, Environment Canada

# Conservation & Protection, Regional and Headquarters' Office Addresses

**Headquarters**
351 St. Joseph Boulevard
Place Vincent Massey
Hull, Québec
K1A 0H3

**Atlantic Region**
15th Floor, Queen Square
45 Alderney Drive
Dartmouth, Nova Scotia
B2Y 2N6

**Québec Region**
1141 Route de L'Eglise
P.O. Box 10100
Sainte Foy, Quebec
G1V 4H5

**Ontario Region**
25 St. Clair Ave. East, 6th Floor
Toronto, Ontario
M4T 1M2

**Western and Northern Region**
Room 210, Twin Atria # 2
4999 -98 Avenue
Edmonton, Alberta
T6B 2X3

**Pacific and Yukon Region***
224 West Esplanade Street
North Vancouver, British Columbia
V7M 3H7

---

* A BASIC computer program for calculating LC50s is avaible for copying onto a formatted 13-cm IBM-compatible floppy disk supplied by the user, by contacting the Aquatic Toxicity Laboratory at this address.

# Série de la Protection de l'environnement

## Méthode d'essai biologique :

## méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel

Méthode de référence SPE 1/RM/13
Juillet 1990

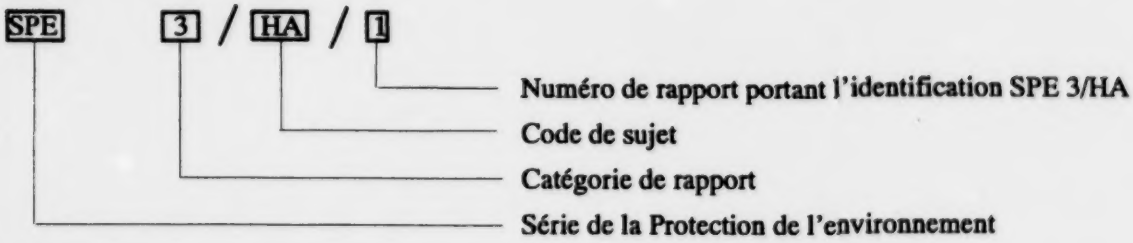
IMPRIMÉ AU CANADA

Canada

Environnement Canada Environment Canada

## SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

**Exemple de numérotation :**


SPE
3 / HA / 1
Numéro de rapport portant l'identification SPE 3/HA
Code de sujet
Catégorie de rapport
Série de la Protection de l'environnement

**Catégories**

1 Règlements/Lignes directrices/ Codes de pratiques
2 Évaluation des problèmes et options de contrôle
3 Recherche et développement technologique
4 Revues de la documentation
5 Inventaires, examens et enquêtes
6 Évaluations des impacts sociaux, économiques et environnementaux
7 Surveillance
8 Propositions, analyses et énoncés de principes généraux
9 Guides

**Sujets**

AG Agriculture
AN Technologie anaérobie
AP Polluants atmosphériques
AT Toxicité aquatique
CC Produits chimiques commerciaux
CE Consommateurs et environnement
CI Industries chimiques
FA Activités fédérales
FP Traitement des aliments
HA Déchets dangereux
IC Chimie inorganique
MA Pollution marine
MM Exploitation minière et traitement des minéraux
NR Régions du Nord et rurales
PF Papier et fibres
PG Production d'électricité
PN Pétrole et gaz naturel
RA Réfrigération et climatisation
RM Méthodes de référence
SF Traitements de surface
SP Déversements de pétrole et de produits chimiques
SRM Méthodes de référence normalisées
TS Systèmes de transport
TX Textiles
UP Pollution urbaine
WP Protection/préservation du bois

Des sujets et des codes additionnels sont introduits au besoin. On peut obtenir une liste des publications de la SPE en s'adressant aux Publications de la Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3.

Think Recycling!
Pensez à recycler !

*Cette publication est imprimée sur du papier contenant des rebuts recyclés.*

# Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel

Protection de l'environnement
Conservation et Protection
Environnement Canada

Méthode de référence SPE 1/RM/13
Juillet 1990

**Données de catalogage avant publication (Canada)**

Vedette principale au titre:

Méthode d'essai biologique. Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel

(Méthode de référence ; SPE 1/RM/13)
Texte en français et en anglais disposé tête-bêche.
Titre de la p. de t. addit.: Biological test method, reference method for determining acute lethality of effluents to rainbow trout.
Comprend des références bibliographiques.
ISBN 0-662-57746-9
N° de cat. MAS En49-24/1-13

1. Truite arc-en-ciel -- Mortalité -- Essais -- Normes -- Canada. 2. Truite arc-en-ciel -- Microbiologie -- Normes -- Canada. 3. Effluents -- Qualité -- Essais -- Normes -- Canada. I. Canada. Direction générale de la protection de l'environnement. II. Canada. Environnement Canada. III. Coll.: Rapport (Canada. Environnement Canada) ; SPE 1/RM/13. IV. Titre. V. Titre: Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel.

QL638.S2 1990 597.'55 C90-098700-6F

© Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1990
No de catalogue En 49-24/1-13
ISBN 0-662-57746-9
IMPRIMERIE BEAUREGARD LIMITÉE

# Commentaires

Pour formuler des commentaires ou obtenir des renseignements sur l'utilisation de la présente méthode de référence, s'adresser à :

M. Gary Sergy
Direction du développement technologique
Environnement Canada
4999, 98$^{e}$ avenue, pièce 210
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

M. Richard Scroggins
Direction des programmes industriels
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

Dans le présent document, la mention d'appellations commerciales ne constitue nullement une recommandation de la part d'Environnement Canada; d'autres produits de valeur semblable peuvent être utilisés.

# Résumé

*Le présent document décrit en termes explicites une méthode de référence pour la mesure de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss). *Il donne des instructions précises pour l'exécution d'essais de létalité aiguë portant sur des échantillons d'effluents et pour la présentation des résultats de ces essais; il complète ainsi les directives générales fournies dans le document de méthodologie intitulé* Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel *(Environnement Canada, 1990a).*

*Trois méthodes sont exposées : 1) pour un essai à concentration unique portant sur l'effluent non dilué, sauf indication contraire; 2) pour un essai à concentrations multiples visant à déterminer la concentration létale 50 ($CL_{50}$) de l'effluent; 3) pour un essai portant sur un produit toxique de référence. Des instructions sont fournies concernant la détention des truites au laboratoire, les installations et l'approvisionnement en eau, la manipulation et le stockage des échantillons, la préparation des solutions, les conditions de l'essai, les observations à faire, les résultats de l'essai et les méthodes de calcul connexes ainsi que l'utilisation de produits toxiques de référence.*

# Table des matières

**Résumé** ..... v
**Glossaire** ..... ix
**Remerciements** ..... xiii

*Section 1*
**Introduction** ..... 1

*Section 2*
**Organismes et détention** ..... 3
**2.1** Espèce et source ..... 3
**2.2** Détention et acclimatation ..... 3
**2.3** Eau ..... 4
**2.4** Conditions physico-chimiques ..... 5

*Section 3*
**Installations** ..... 6

*Section 4*
**Mode opératoire général pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents** ..... 7
**4.1** Étiquetage, transport et stockage des échantillons ..... 7
**4.2** Conditions de l'essai ..... 7
**4.3** Préparation des solutions d'essai ..... 8
**4.4** Mise en route de l'essai ..... 8
**4.5** Observations et mesures ..... 9

*Section 5*
**Mode opératoire pour l'essai d'une concentration unique d'effluent** ..... 10

*Section 6*
**Mode opératoire pour la détermination de la $CL_{50}$ d'un effluent** ..... 11

*Section 7*
**Mode opératoire pour l'essai d'un produit toxique de référence** ..... 12

*Section 8*
**Présentation des résultats** ..... **14**
**8.1** Données à consigner au procès-verbal ..... **14**
**8.1.1** Effluent ..... **14**
**8.1.2** Installations et conditions de l'essai ..... **14**
**8.1.3** Résultats ..... **15**
**8.2** Données à verser au dossier ..... **15**
**8.2.1** Effluent ..... **15**
**8.2.2** Installations et conditions de l'essai ..... **16**
**8.2.3** Résultats ..... **17**

**Références** ..... **18**

*Annexe*
**Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique et adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection** ..... **21**

# Glossaire

Toutes les définitions ci-après s'appliquent aux méthodes énoncées dans le présent rapport; les autres définitions figurant dans le document d'accompagnement détaillé (Environnement Canada, 1990a) s'y appliquent aussi.

Acclimatation - Adaptation physiologique à un niveau précis d'une ou de plusieurs variables environnementales, par exemple la température. Ce terme s'applique généralement à des conditions contrôlées en laboratoire.

Aigu - Survenant dans un bref délai, normalement 96 h ou moins dans le cas des poissons.

Alevin - Poisson éclos récemment, ne pouvant se nourrir seul et dont le sac vitellin est évident (à des fins nutritives). L'alevin est souvent appelé «larve vésiculée».

Alevin au stade de l'alimentation active - Jeune poisson ayant dépassé le stade larvaire et ayant commencé à se nourrir seul activement.

$CL_{50}$ - Concentration létale 50, soit la concentration dans l'eau d'une substance (dans le cas qui nous occupe, un effluent) qui est censée être létale pour 50 % des organismes soumis à l'essai après une durée d'exposition définie (p. ex., 96 h).

Conductivité - Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de transporter un courant électrique. Cette capacité dépend des concentrations des ions en solution, de leur valence et de leur mobilité, ainsi que de la température de la solution. La conductivité s'exprime normalement en millisiemens par mètre (unité SI), ou en µmho/cm (1 mS/m = 10 µmho/cm).

Contrôle - Traitement reproduisant l'ensemble des facteurs qui pourraient influencer les résultats d'une enquête ou d'une étude, à l'exception de la condition particulière faisant l'objet de cette étude. Dans un essai de toxicité aquatique, le contrôle doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, sans porter sur la substance à expérimenter. Le contrôle est utilisé pour établir l'absence de

toxicité en raison de conditions de base de l'essai, telles que la qualité de l'eau de dilution et l'état de santé ou la manipulation des organismes soumis à l'essai.

Dureté - Somme des concentrations de calcium et de magnésium dans l'eau, exprimée en mg/L de carbonate de calcium.

Eau de contrôle/de dilution - Eau utilisée pour le contrôle, pour diluer la substance à expérimenter ou à l'une et l'autre de ces fins.

Eau de dilution - Eau utilisée pour diluer la substance à expérimenter afin d'en préparer différentes concentrations pour l'essai de toxicité.

Eau déchlorée - Eau chlorée (généralement, eau potable municipale) qu'on a traitée afin d'en éliminer le chlore.

Effluent - Tout déchet liquide (industriel ou urbain) rejeté dans l'environnement aquatique.

Essai à renouvellement continu - Essai de toxicité pendant lequel les solutions des réservoirs d'essai sont renouvelées en continu par l'apport constant d'une solution fraîche ou par un apport intermittent fréquent.

Essai à renouvellement périodique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai sont renouvelées périodiquement, généralement aux 24 heures.

Essai statique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées.

Évident - Clairement discernable dans les conditions d'essai utilisées.

Fingerling - Jeune poisson de moins d'un an se nourrissant seul.

Létal - Entraînant la mort par action directe. Dans le cas d'un poisson, on entend par «mort» la cessation de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité.

Longueur à la fourche - Longueur du poisson, du museau (gueule fermée) jusqu'à la fourche de la queue.

Lux - Unité SI d'éclairement, mesurant l'intensité lumineuse par mètre carré. 1 lux = 0,0929 pied-bougie; 1 pied-bougie = 10,76 lux.

pH - Logarithme négatif de l'activité des ions d'hydrogène, mesurée par leur concentration en moles par litre. Cette valeur exprime le degré ou l'intensité des réactions acides et alcalines selon une échelle de 0 à 14, où le nombre 7 représente la neutralité et les nombres inférieurs correspondent, en ordre décroissant, à des réactions acides de plus en plus fortes. Les chiffres supérieurs à 7 indiquent, en ordre croissant, des réactions basiques ou alcalines de plus en plus fortes.

Photopériode - Durée d'éclairement et d'obscurité au cours d'un cycle de 24 h.

Prétraitement - Dans le présent rapport, traitement d'un échantillon ou de sa dilution avant l'exposition des poissons.

Produit toxique de référence - Produit chimique étalon utilisé pour évaluer la sensibilité des organismes soumis à l'essai et la validité des mesures de la toxicité des effluents.

Salinité - Quantité totale, en grammes, de solides dissous dans 1 kg d'eau de mer. Elle se détermine après conversion de tous les carbonates en oxydes, après remplacement de tous les bromures et iodures par des chlorures et après oxydation de toutes les matières organiques. La salinité peut aussi se mesurer directement grâce à un salinimètre/conductimètre ou par d'autres moyens (APHA *et al.*, 1989). Elle s'exprime habituellement en parties par millier (‰).

Sublétal - Nocif pour les poissons, mais en deçà du niveau qui entraîne directement la mort pendant la durée de l'essai.

Toxicité - Capacité propre d'une substance de provoquer des effets nocifs chez les organismes vivants.

# Remerciements

La présente méthode de référence a été établie en fonction des objectifs, des besoins et des commentaires d'un sous-comité de la Protection de l'environnement (PE) formé de : N. Bermingham (PE, Montréal), C. Blaise (PE, Longueuil), G. Coulombe (PE, Montréal), K. Doe (PE, Dartmouth), G. Elliott (PE, Edmonton), D. MacGregor (PE, Ottawa), J. MacLatchy (PE, Ottawa), W. Parker (PE, Dartmouth), D. Robinson (Pêches et Océans Canada, Ottawa), T. Ruthman (PE, Ottawa), R. Scroggins (PE, Ottawa), G. Sergy (PE, Edmonton) et R. Watts (PE, North Vancouver). Pour leur contribution et leurs commentaires fort utiles, les représentants des provinces au sein du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA) ont particulièrement droit à notre reconnaissance (G. Joubert, ministère de l'Environnement du Québec; G. Westlake, ministère de l'Environnement de l'Ontario; W. Young, ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique du Manitoba; K. Lauten, ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique de la Saskatchewan; J. Somers, ministère de l'Environnement de l'Alberta; S. Horvath et G. van Aggelen, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique). Nous remercions sincèrement de leurs observations les examinateurs externes suivants : D. Vaughan (PE, Dartmouth), S. Wade (PE, Dartmouth), A. Beckett (PE, Edmonton), F. Zaal (PE, Edmonton), S. Yee (PE, North Vancouver), D. Moul (PE, North Vancouver), V. Zitko (Pêches et Océans Canada, St. Andrews), V. Cairns (Pêches et Océans Canada, Burlington), S. Samis, (Pêches et Océans Canada, Vancouver), R. Martin (ministère de l'Environnement et des Terres de Terre-Neuve, St. John's), J. Lee (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale), J. Moores (ministère de l'Environnement de l'Alberta, Vegreville), P. Martel (Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers, Pointe-Claire), Y. Bois (Technitrol·Eco Inc., Pointe-Claire), C.R. Cook (Produits forestiers E.B. Eddy Ltée, Espanola), G. Craig (Beak Consultants Ltd., Brampton), et D. Bradley, D. Monteith et J. Pickard (B.C. Research Corp., Vancouver). Nous tenons également à remercier l'équipe des laboratoires d'essai d'Environnement Canada (adresses à l'annexe).

MM. G. Sergy et R. Scroggins (PE, Environnement Canada) ont fait fonction de responsables scientifiques officiels et ont fourni leur collaboration et leurs conseils techniques. Le document a été rédigé en collaboration par MM. Don McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, C.-B.) et John Sprague (J.B. Sprague Associates Ltd., Guelph, Ontario).

*Section 1*

# Introduction

Le présent document décrit les modes opératoires à employer pour les essais de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel qui sont exigés par le gouvernement du Canada dans les règlements sur la lutte contre la pollution applicables à diverses catégories d'industries. La truite arc-en-ciel est utilisée depuis deux décennies au Canada pour les essais d'effluents prévus par une série de règlements et de lignes directrices (SPE, 1971, 1973, 1974, 1977a-c, 1984). Une méthode normalisée existante (SPE, 1980) a servi de fondement pour l'établissement de la présente méthode de référence, qu'on devrait utiliser conjointement avec un document plus complet qui présente des explications et des détails additionnels (Environnement Canada, 1990a).

Par bien des aspects, les modes opératoires exposés ci-après sont semblables à des méthodes établies par les provinces canadiennes (McGuinness, 1982; Rocchini *et al.*, 1982; Craig *et al.*, 1983; Ontario, 1989) ou employées aux États-Unis (ASTM, 1980; EPA, 1985a, 1985b; APHA *et al.*, 1989) et dans d'autres pays (BHSC, 1982; UKWRC, 1983; OCDE, 1984). Ces méthodes se sont révélées fort utiles à la rédaction de l'ensemble du présent document, et elles constituent des sources de renseignements complémentaires très valables. Toutefois, aux fins de la réglementation, ce sont les modes opératoires présentés ci-après qu'on devrait appliquer.

L'organisme soumis à l'essai est la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, auparavant *Salmo gairdneri*), qui provient de l'ouest de l'Amérique du Nord, mais qui fréquente maintenant les eaux de toutes les provinces canadiennes et est très répandue dans le monde entier. Elle prospère dans les eaux froides et douces, fréquente les eaux côtières de l'Atlantique et du Pacifique et est couramment élevée dans des écloseries et des établissements commerciaux d'aquiculture. Elle est devenue, dans le monde entier, le poisson d'eau froide étalon pour les essais de toxicité en eau douce, et on dispose à son sujet d'une banque de données toxicologiques d'une ampleur appréciable.

Trois modes opératoires de base sont décrits ci-après. Le premier porte sur une concentration unique d'effluent (l'échantillon non dilué, sauf indication contraire) et sur un contrôle, et il conviendrait à des essais comportant une cote de réussite ou d'échec. Le deuxième permet d'établir la concentration létale 50 ($CL_{50}$), c'est-à-dire de déterminer le degré de toxicité de l'effluent au moyen de diverses concentrations, dont l'échantillon non dilué. Le troisième s'applique à un essai à concentrations multiples portant sur un produit toxique de référence, qui permet d'évaluer la sensibilité des poissons soumis à l'essai à un produit toxique étalon ainsi que la précision des données produites par le laboratoire.

Les essais doivent porter sur des effluents contenant de l'eau douce ou ayant une salinité inférieure ou égale à 10 ‰, définie par une conductivité inférieure ou égale à

1 400 mS/m à une température de 15 °C. Les effluents de salinité supérieure à 10 ‰ qui sont rejetés dans des eaux douces devraient aussi faire l'objet d'essais portant sur des truites arc-en-ciel acclimatées à l'eau douce; pour ceux qui sont rejetés directement en mer, on devrait utiliser une espèce autorisée par le laboratoire régional d'Environnement Canada (adresses à l'annexe) et acclimatée à une eau de mer de salinité semblable à celle de l'échantillon.

*Section 2*

# Organismes et détention

## *2.1 Espèce et source*

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) doit être utilisée pour les essais. On peut se servir d'alevins ayant atteint le stade de l'alimentation active depuis au moins deux semaines ou de fingerlings. Le poids frais moyen des poissons devrait être compris entre 0,3 et 5 g, et le plus gros poisson devrait ne pas être plus de deux fois plus long que le plus petit poisson soumis au même essai.

On peut se procurer les poissons aux stades de l'oeuf embryonné, de l'alimentation active ou de fingerling. Tous devraient provenir de la même population et de la même écloserie et être exempts de toute maladie. Leur obtention et leur expédition devraient être approuvées par des représentants régionaux du comité fédéral-provincial des transplantations d'espèces de Pêches et Océans Canada, dans les provinces où ce comité contrôle les mouvements des stocks de poissons. Pour obtenir des conseils sur les sources de truites, on peut communiquer avec les bureaux régionaux d'Environnement Canada (adresses à l'annexe).

## *2.2 Détention et acclimatation*

Les poissons devraient être élevés dans des réservoirs et d'autres installations fabriqués de matériaux non toxiques comme l'acier inoxydable, la porcelaine, le polyester armé de fibre de verre, l'acrylique, le polyéthylène ou le polypropylène. Les oeufs et les alevins peuvent être incubés dans des plateaux d'alevinage à débit vertical ou dans des bassins à écoulement d'eau (Leitritz et Lewis, 1976). Les alevins et les fingerlings peuvent être élevés et acclimatés dans des bassins ou des réservoirs où l'eau peut s'écouler, à l'abri de toute agitation et, de préférence, dans un endroit séparé des réservoirs d'essai.

L'élevage peut se faire en plein air, mais on doit prévoir deux ou, de préférence, trois semaines ou plus d'acclimatation aux conditions d'éclairement et de température établies pour l'essai (section 2.4). Cette acclimatation peut aussi se dérouler à l'extérieur, les réservoirs étant dotés de couvercles munis d'appareils d'éclairage à réglage photopériodique. Environnement Canada (1990a) fournit des détails additionnels sur la détention et l'acclimatation des poissons devant être soumis à des essais de toxicité.

Les réservoirs devraient rester propres, la nourriture excédentaire et les excréments étant siphonnés aussi souvent que nécessaire. Il est recommandé d'utiliser des réservoirs dotés de colonnes d'alimentation doubles et centrales, qui assurent un autonettoyage partiel. Il faudrait désinfecter les réservoirs et les rincer à fond avec de l'eau ayant servi à la détention ou à l'acclimatation des poissons avant d'y déposer un nouveau lot de poissons. On devrait utiliser des désinfectants renfermant des composés chlorés ou iodophores ou du chlorure de n-alkyldiméthylbenzylammonium.

Sauf indication contraire du fabricant, il faudrait nourrir les poissons une ou plusieurs fois par jour avec une nourriture en boulettes commerciale (standard) reconnue, la ration quotidienne variant entre 1 et 5 % du poids frais des poissons, selon la température de l'eau et leur taille (Environnement Canada, 1990a). Le type et la taille des boulettes devraient être choisis en fonction de la taille et de l'âge des poissons, de la température et l'eau et des recommandations du fabricant; on devrait aussi suivre les recommandations du fabricant en ce qui touche la durée et la méthode de stockage de la nourriture.

Les poissons morts ou moribonds devraient être enlevés immédiatement après l'inspection quotidienne. Pendant la période de sept jours précédant l'essai, le taux de mortalité devrait être inférieur à 2 % dans les réservoirs d'où proviennent les poissons soumis à l'essai. Si ce taux est compris entre 2 et 10 %, la durée d'acclimatation devrait être prolongée d'au moins sept autres jours, soit jusqu'à ce qu'il n'y ait pas plus de 2 % de mortalités par tranche de sept jours. Si le taux de mortalité dépasse 10 % par semaine, le groupe de poissons est inadmissible pour utilisation ultérieure lorsque les mortalités sont causées par la maladie ou la présence de contaminants aquatiques; lorsqu'elles sont attribuables à d'autres facteurs (p. ex., taux de mortalité initial élevé pendant le passage au stade de l'alimentation active ou à la suite du transfert des poissons), on peut utiliser les poissons pour des essais de toxicité à condition que le taux de mortalité dans les réservoirs d'où ils proviennent baisse à moins de 2 % pendant les sept jours précédant immédiatement l'essai. Il faudrait éviter de traiter les poissons à l'aide de produits chimiques antimaladie; si on le fait, il faut attendre au moins quatre semaines avant de les utiliser pour des essais. L'essai portant sur un produit toxique de référence (section 7) permet d'évaluer dans une certaine mesure si les poissons conviennent à des essais de toxicité.

## *2.3 Eau*

L'eau pour la détention et l'acclimatation des poissons peut être de l'eau souterraine ou de surface non contaminée ou de l'eau potable municipale déchlorée; elle devrait favoriser de façon constante la survie, la santé et le développement de la truite arc-en-ciel. On devrait évaluer la qualité chimique de l'eau du laboratoire aussi souvent que nécessaire pour en consigner les variations. On devrait mesurer au moins la dureté, le pH, la conductivité, l'oxygène dissous et le chlore résiduel total (s'il s'agit d'eau municipale déchlorée) et, si cela est possible, l'alcalinité, les solides en suspension, le carbone organique total, les gaz totaux dissous, l'ammoniac, les nitrites, les métaux et l'ensemble des pesticides organophosphorés. Toute sursaturation en gaz devrait être éliminée (Environnement Canada, 1990a).

S'il faut utiliser de l'eau municipale, on doit voir à ce qu'elle soit exempte de toute concentration nocive de chlore au moment de l'exposition des poissons. L'objectif établi pour la concentration en chlore résiduel total dans les réservoirs de détention et dans l'eau de contrôle/de dilution des réservoirs d'essai est d'au plus 0,002 mg/L (Environnement Canada, 1990a).

On devrait admettre dans les réservoirs de détention et d'acclimatation au moins 1 L/min d'eau fraîche par kilogramme de poissons détenus (soit 1,4 $L/g \cdot d^{-1}$ ou 0,69 g·d/L). De plus, les réservoirs devraient renfermer, en tout temps, au moins 1 L d'eau pour chaque tranche de 10 g de poissons détenus. Dans des circonstances exceptionnelles, il peut être admissible de

nettoyer et de recirculer l'eau (Environnement Canada, 1990a).

## *2.4 Conditions physico-chimiques*

L'éclairement devrait être assuré par des appareils fluorescents suspendus à spectre continu; à la surface, il devrait être d'au plus 500 lux. Pendant au moins deux semaines avant l'essai, on doit maintenir une photopériode constante de 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité, préférablement avec une période de transition de 15 à 30 minutes.

La température de détention peut se situer entre 4 et 18 °C, mais les poissons doivent être acclimatés pendant au moins deux semaines et, de préférence, pendant trois semaines ou plus, à une température de 15 ± 2 °C avant d'être soumis à un essai. La température de l'eau peut être modifiée à raison d'au plus 3 °C/d. La teneur en oxygène dissous de l'eau des réservoirs devrait être de 80 à 100 % de saturation en air. Au besoin, on devrait assurer une aération complémentaire des réservoirs au moyen d'air comprimé filtré et exempt d'huile. Le pH de l'eau devrait être compris entre 6,0 et 8,5. On devrait contrôler, de préférence tous les jours, la température de l'eau de chaque bassin d'acclimatation ou de détention ainsi que sa teneur en oxygène dissous, son pH, son débit et le nombre de poissons morts; il est aussi recommandé de contrôler chaque semaine, ou plus fréquemment, la teneur de l'eau en ammoniac, en nitrites et en chlore résiduel total (si l'eau est fournie par une municipalité).

*Section 3*

# Installations

L'essai doit être réalisé dans une installation isolée des allées et venues générales du laboratoire, soit dans une pièce isolée ou dans une zone entourée d'un mur ou d'un rideau. La poussière et les émanations devraient être réduites au minimum. On peut maintenir la température d'essai (15 ± 1 °C) au moyen d'un appareil de conditionnement de l'air réglé par thermostat ou en immergeant les réservoirs d'essai dans des bains-marie à température contrôlée.

Les réservoirs d'essai et tout le matériel ou l'équipement pouvant entrer en contact avec les solutions d'essai ou l'eau de contrôle/de dilution ne doivent pas contenir de substances pouvant être entraînées dans les solutions d'essai ou absorber les produits toxiques qu'elles contiennent. Les réservoirs d'essai doivent être en verre, en Plexiglas, en acrylique, en polypropylène ou en polyéthylène, ou être revêtus de polyéthylène; si l'on utilise des revêtements, il faut les jeter à la fin de l'essai. Il est recommandé de couvrir les réservoirs d'essai (Environnement Canada, 1990a). Tous les réservoirs utilisés pour un même essai devraient être identiques et contenir au moins 15 cm d'eau. L'équipement doit être nettoyé et rincé à fond conformément à de bonnes pratiques de laboratoire.

L'eau de contrôle/de dilution devrait correspondre à la description fournie à la section 2.3 et, de préférence, être identique à l'eau utilisée pour la détention et l'acclimatation des poissons.

*Section 4*

# Mode opératoire général pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents

## *4.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons*

Le volume requis pour les échantillons dépend de la taille des poissons, du nombre de poissons par solution d'essai, des exigences concernant la densité de chargement, des concentrations d'essai et de l'utilisation de répétitions. Normalement, le volume nécessaire est de 25 à 50 L ou plus pour les essais à concentration unique et de 50 à 100 L ou plus pour ceux visant à établir une $CL_{50}$.

Les contenants utilisés pour le transport et le stockage des échantillons doivent être fabriqués de matériaux non toxiques (p. ex., bonbonnes ou seaux de polyéthylène ou de polypropylène). Ils doivent être neufs, ou encore nettoyés à fond et séchés, et on peut les rincer avec de l'eau propre, puis avec l'échantillon à recueillir. Il faudrait les remplir afin de réduire les vides d'air, puis les fermer hermétiquement. L'étiquette qu'ils portent doit indiquer au moins le type d'échantillon, la source, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le nom des préposés à l'échantillonnage.

Les échantillons ne devraient pas geler. Pendant le transport, ils devraient être conservés dans l'obscurité, à une température de 1 à 8 °C si le voyage dure plus de deux jours. À l'arrivée au laboratoire, ils peuvent être ramenés immédiatement ou pendant la nuit à 15 °C et les essais peuvent être entrepris. S'ils sont stockés à l'installation d'essai, il faut les conserver dans l'obscurité et au frais (à moins de 8 °C et, de préférence, à 4 ± 2 °C).

L'essai des échantillons devrait être entrepris le plus tôt possible après leur prélèvement. Il devrait débuter dans les trois jours et doit être commencé au plus tard cinq jours après la fin des prélèvements. On doit agiter vigoureusement les échantillons juste avant d'en verser des aliquotes pour préparer les solutions. Les sous-échantillons (c.-à-d. les échantillons répartis dans deux ou plusieurs contenants) doivent être combinés.

## *4.2 Conditions de l'essai*

Il s'agit d'un essai statique, c.-à-d. sans renouvellement des solutions, d'une durée de 96 h. La densité de chargement de poissons dans chaque réservoir d'essai ne devrait pas dépasser 0,5 g/L pendant quatre jours (soit 2 $L/g \cdot 4d^{-1}$; 0,5 $L/g \cdot d^{-1}$). Il ne faut pas nourrir les poissons pendant l'essai ni pendant les 24 h qui précèdent. L'essai n'est pas valable si plus de 10 % des poissons témoins meurent ou laissent apparaître un comportement atypique ou stressé (Environnement Canada, 1990a).

L'essai doit être mené à 15 ± 1 °C. Toutes les solutions sont aérées pendant l'essai. L'éclairement et la photopériode (16 ± 1 h de lumière, 8 ± 1 h d'obscurité) doivent être les mêmes que pendant l'acclimatation (section 2.4).

L'essai doit être réalisé sans correction du pH de l'échantillon ou des solutions. Toutefois, si l'on désire comprendre dans quelle mesure les valeurs extrêmes du pH (c.-à-d. les valeurs inférieures à 5,5 ou supérieures à 8,5) peuvent contribuer à la létalité aiguë de l'échantillon ou des solutions, on peut effectuer parallèlement un deuxième essai (avec correction du pH). Si deux essais sont ainsi menés, les résultats définitifs devraient être ceux obtenus à la suite de l'essai sans correction du pH. Environnement Canada (1990a) fournit des explications et des détails concernant la correction du pH. Celle-ci compte parmi les techniques d'évaluation d'identification de la toxicité qui permettent de définir la cause de la toxicité des échantillons (Mount et Anderson-Carnahan, 1988).

## *4.3 Préparation des solutions d'essai*

La température de l'échantillon d'effluent et de l'eau de contrôle/de dilution doit être ramenée à 15 ± 1 °C si elle ne se situe pas déjà dans cet intervalle.

Pour un essai donné, il faut utiliser la même eau pour préparer la ou les solutions de contrôle et toutes les concentrations d'essai inférieures à 100 %. Il s'agit presque toujours de la même eau qui a servi à l'acclimatation. Si l'on en augmente la température, il faut éviter la sursaturation en gaz. L'eau doit avoir une teneur en oxygène de 90 à 100 % de saturation en air, obtenue au besoin grâce à une aération vigoureuse au moyen d'air comprimé exempt d'huile passant par des pierres de barbotage ou un diffuseur en verre.

Les réservoirs d'essai devraient être rincés avec de l'eau de contrôle/de dilution juste avant d'être utilisés, mais cela n'est pas nécessaire si l'on a recours à des revêtements de polyéthylène. Les solutions d'essai doivent être préparées et bien mélangées avec une baguette de verre, un agitateur en téflon ou un autre dispositif non réactif, juste avant leur utilisation. Tous les réservoirs, dispositifs de mesure, appareils d'agitation et seaux pour le transfert des poissons doivent être nettoyés et rincés à fond, conformément aux modes opératoires normalisés.

Une fois préparée, chaque solution d'essai devrait être aérée pendant 30 minutes à raison d'au plus 7,5 $mL/min \cdot L^{-1}$. Par la suite, on doit mesurer la teneur en oxygène dissous au moins dans la solution de la concentration la plus élevée (normalement, l'échantillon non dilué). Seulement lorsque cette valeur est inférieure à 70 % ou supérieure à 100 % de saturation en air, il faut, avant l'exposition des poissons, continuer d'aérer toutes les solutions d'essai, y compris les solutions de contrôle, à raison d'au plus 7,5 $mL/min \cdot L^{-1}$. Cette période de préaération doit être limitée à 90 minutes ou, si cette durée est plus courte, au temps voulu pour obtenir 70 % de saturation en air dans la solution d'essai de la concentration la plus élevée (ou 100 % de saturation, s'il y avait sursaturation). Immédiatement après, on doit déposer les poissons dans les solutions et mettre en route l'essai, qu'on ait obtenu ou non de 70 à 100 % de saturation dans toutes les solutions d'essai. L'aération devrait être assurée par des bulles d'air comprimé passant par un diffuseur d'air propre en verre de silice ou par une pipette de verre jetable (Environnement Canada, 1990a). La taille des bulles d'air devrait être de 1 à 3 mm.

## *4.4 Mise en route de l'essai*

Chaque réservoir d'essai doit porter un code ou une étiquette précisant clairement la concentration de la solution ainsi que la date et l'heure du début de l'essai. Les réservoirs

devraient être installés de façon à faciliter l'observation des poissons; de préférence, les concentrations à expérimenter devraient être placées selon un ordre aléatoire. Chaque solution devrait être aérée à raison d'au plus 7,5 $mL/min \cdot L^{-1}$ pendant tout l'essai, au moyen d'un des diffuseurs d'air mentionnés à la section 4.3.

Si une ou plusieurs solutions d'essai sont fortement colorées, opaques ou mousseuses, on peut utiliser des paniers d'un matériau non toxique et non abrasif (p. ex., nylon, polyéthylène ou polypropylène) pour inspecter les poissons pendant l'essai. On devrait alors placer un de ces paniers dans chacun des réservoirs contenant les solutions d'essai et de contrôle. Les paniers devraient être assez grands pour permettre aux poissons de se déplacer dans tout le réservoir. Avant usage, chaque panier doit être nettoyé et rincé à fond avec de l'eau de contrôle/de dilution.

Les poissons doivent être déposés en nombres égaux dans chaque solution d'essai et de contrôle. On devrait utiliser au moins dix poissons par solution. Ils peuvent être répartis entre deux réservoirs ou plus, de façon à respecter la densité de chargement requise. L'ordre selon lequel on dépose les poissons dans les réservoirs d'essai devrait être établi au hasard au préalable. Chaque poisson devrait être utilisé une seule fois, et les méthodes de manipulation devraient réduire le stress au minimum (Environnement Canada, 1990a).

## *4.5 Observations et mesures*

On devrait noter au début de l'essai la couleur, la turbidité et l'odeur de l'échantillon, ainsi que la présence de solides flottants ou décantables. Il faudrait aussi observer l'apparence des solutions d'essai, et consigner les modifications évidentes survenant au cours de l'essai.

Au moins au début et à la fin de l'essai, il faut mesurer le pH et la teneur en oxygène dissous de chaque solution d'essai, y compris les solutions de contrôle. Les dernières mesures devraient être effectuées une fois les observations biologiques terminées. On devrait mesurer la conductivité de chaque solution au moins au début de l'essai et, chaque jour, mesurer la température de solutions représentatives.

Il faudrait inspecter chaque réservoir d'essai au moins 24, 48, 72 et 96 h après le début de l'essai, consigner le nombre de poissons morts et enlever ces poissons. Les poissons sont réputés morts quand ils ne laissent apparaître aucun signe d'activité operculaire ou autre et qu'ils ne réagissent pas à une légère poussée. Il faudrait également consigner les effets toxiques sublétaux évidents (Environnement Canada, 1990a). Si les solutions sont fortement colorées, opaques ou mousseuses, on peut inspecter les poissons au moyen d'une épuisette (nettoyée et rincée avant usage) ou en les soulevant à la surface au moyen d'un panier approprié (section 4.4). On devrait déterminer, à la fin de l'essai, la longueur à la fourche et le poids frais moyens ($\pm$ l'écart type) des poissons témoins.

*Section 5*

# Mode opératoire pour l'essai d'une concentration unique d'effluent

Toutes les conditions, méthodes et installations prévues aux sections 1, 2, 3, 4, 7 et 8 s'appliquent au présent mode opératoire.

L'essai porte sur une seule concentration d'effluent, soit l'effluent non dilué, sauf indication contraire, et sur une solution de contrôle. On peut prévoir des répétitions, mais cela n'est pas nécessaire. Au moins dix poissons doivent être exposés à chaque solution d'essai et de contrôle. L'essai n'est pas valide si plus de 10 % des poissons témoins meurent ou laissent apparaître un comportement atypique ou stressé.

Le résultat de cet essai est le pourcentage de mortalité à 96 h. On utilise couramment une valeur de 50 %, car elle permet des mesures plus précises que des valeurs telles que 20 ou 80 %, plus proches des valeurs extrêmes de distribution des effets toxiques. Par exemple, au termes du projet de règlement d'Environnement Canada (1990b) sur les effluents des usines de pâtes et papiers, un effluent ne serait pas acceptable si 50 % ou plus des poissons mouraient après avoir été exposés à une concentration de 100 %.

*Section 6*

# Mode opératoire pour la détermination de la $CL_{50}$ d'un effluent

Toutes les conditions, méthodes et installations prévues aux sections 1, 2, 3, 4, 7 et 8 s'appliquent au présent mode opératoire.

L'essai porte sur au moins cinq concentrations d'effluent et sur une solution de contrôle (entièrement composée d'eau de dilution). La concentration la plus élevée doit être l'effluent non dilué, et chaque concentration successive doit correspondre à au moins 50 % de la précédente. Il est avantageux d'utiliser une série géométrique (ou logarithmique), p. ex., des concentrations de 100, 50, 25, 12,5 et 6,3 %. Les concentrations peuvent être basées sur d'autres proportions ou sur des séries de dilutions normalisées (Environnement Canada, 1990a, annexe D).

On peut prévoir des répétitions de chaque concentration, mais cela n'est pas nécessaire. Si on le fait, les données obtenues doivent être combinées pour le calcul de la $CL_{50}$. La précision de l'estimation augmente avec le nombre d'organismes utilisés, mais pas nécessairement son exactitude.

On devrait calculer la $CL_{50}$ à 96 h et ses limites de confiance à 95 % et indiquer la méthode utilisée pour ces calculs. Des programmes informatiques existent à cette fin (Environnement Canada, 1990a), et on devrait y avoir recours. Un programme particulier est recommandé; les personnes qui fournissent une disquette peuvent se le procurer auprès d'Environnement Canada (adresses à l'annexe), avec la permission de C.E. Stephan (1977). On devrait vérifier toute $CL_{50}$ calculée par ordinateur en examinant, sur une échelle de probabilité logarithmique, la courbe des pourcentages de mortalité après 96 h pour les diverses concentrations d'effluent (Environnement Canada, 1990a).

L'essai n'est pas valide lorsque, les données étant combinées s'il y a des répétitions, plus de 10 % des poissons témoins meurent ou laissent apparaître un comportement atypique ou stressé.

*Section 7*

# Mode opératoire pour l'essai d'un produit toxique de référence

On doit utiliser un produit toxique de référence pour évaluer la sensibilité relative des poissons servant aux essais ainsi que la précision des données produites par le laboratoire. Le ou les produits en cause doivent faire l'objet d'un essai au moins une fois par mois civil où l'on procède à des essais d'effluents, et au moment de l'acclimatation d'un nouveau lot de poissons. Les conditions et les méthodes à respecter sont identiques à celles énoncées à la section 4 et déterminées par Environnement Canada (1990a, 1990c), à ceci près que c'est un produit chimique de référence, et non un effluent, qui est mesuré et soumis à l'essai. On devrait utiliser pour ces essais l'eau de contrôle/de dilution qui sert couramment aux essais d'effluents.

On recommande d'utiliser comme produits toxiques de référence du phénol ou du sulfate de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) de qualité «réactif». La $CL_{50}$ à 96 h devrait être déterminée pour le ou les produits toxiques de référence utilisés et exprimée sous forme de mg/L de phénol ou de zinc ($Zn^{++}$) (Environnement Canada, 1990a). Les solutions mères de phénol doivent être préparées le jour même de leur utilisation; les solutions de zinc, dont le pH doit varier de 3 à 4, peuvent être conservées dans l'obscurité.

Les concentrations des produits toxiques de référence dans toutes les solutions mères devraient être mesurées au moyen de méthodes chimiques appropriées (APHA *et al.*, 1989). Au moment de la préparation des solutions d'essai, on devrait prélever des aliquotes au moins dans la solution de contrôle et dans les solutions à teneur inférieure, moyenne et supérieure; ces aliquotes devraient être analysées immédiatement ou stockées pour analyse future, au cas où la $CL_{50}$ serait atypique (à l'extérieur des limites de contrôle). Si elles sont stockées, on devrait les tenir à l'obscurité, à une température de 4 ± 2 °C. Les aliquotes de zinc et de phénol devraient être préservées avant d'être stockées (APHA *et al.*, 1989). Les aliquotes stockées nécessitant une mesure chimique devraient être analysées aussitôt l'essai de toxicité terminé. Il est souhaitable, mais non nécessaire, de mesurer les concentrations dans les mêmes solutions à la fin de l'essai, une fois terminées les observations biologiques. Le calcul de la $CL_{50}$ devrait être fondé sur les concentrations mesurées, si elles diffèrent appréciablement (c.-à-d. d'au moins 20 %) des concentrations nominales.

Une carte de contrôle (EPA, 1985a; Environnement Canada, 1990c) ou un document semblable doit être établi et mis à jour pour chaque produit toxique de référence utilisé. On doit y inscrire les $CL_{50}$ successives qui sont calculées, pour déterminer si elles s'inscrivent dans un intervalle de ± 2 fois l'écart type de la moyenne géométrique (ou de la moyenne arithmétique, lorsque les données ne sont pas réparties normalement) des $CL_{50}$ calculées antérieurement. La moyenne géométrique et ses limites de contrôle (± 2 fois l'écart type, toujours calculé sur une base logarithmique)

sont recalculées pour chaque $CL_{50}$ successive jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (EPA, 1985a; Environnement Canada, 1990c). Si une $CL_{50}$ s'inscrit en dehors des limites de contrôle, la sensibilité des poissons et la validité des essais récents portant sur des effluents sont douteuses. On doit alors vérifier toutes les conditions de détention et d'essai; selon les constatations faites, il se peut qu'on doive prolonger l'acclimatation des poissons et les soumettre à une nouvelle évaluation au moyen d'un ou de plusieurs produits toxiques de référence, ou encore obtenir une nouvelle population de poissons et l'acclimater avant de l'utiliser pour des essais de toxicité.

*Section 8*

# Présentation des résultats

Voici un résumé des exigences de la présente méthode de référence en matière d'établissement du procès-verbal des essais et de tenue de dossiers. Pour de plus amples détails ou des explications, on peut consulter les sections précédentes du présent document.

Sauf indication contraire d'Environnement Canada, tous les renseignements énumérés à la section 8.1 doivent être communiqués à Environnement Canada pour chaque essai de toxicité mené à terme. Ces renseignements doivent être fournis conformément aux règlements pertinents et dans la forme et par les moyens précisés par Environnement Canada* (présentation manuelle ou informatique; mode de transmission; forme et contenu).

Environnement Canada peut aussi exiger la communication d'informations autres que celles prévues à la section 8.1, additionnelles, telles que des renseignements requis en vertu d'un règlement particulier ou nécessaires pour faciliter la compréhension ou l'évaluation des données consignées au procès-verbal.

Sauf indication contraire d'Environnement Canada, les renseignements énumérés à la section 8.2 doivent être consignés et versés au dossier pour une période de cinq ans, et on doit pouvoir les produire à la demande d'Environnement Canada. Ils seront requis de façon moins fréquente, par exemple pendant une vérification ou une enquête.

## *8.1 Données à consigner au procès-verbal*

### *8.1.1 Effluent*

- Nom et adresse de l'installation produisant l'effluent.
- Date et heure du prélèvement de l'échantillon.
- Type d'échantillon (p. ex., «effluent non traité de l'usine», «effluent terminal de l'usine», «rejet de la lagune de déversement en cas d'urgence», «lixiviat»).
- Brève description du lieu de prélèvement.
- Méthode d'échantillonnage (p. ex., «échantillon instantané», «échantillon discontinu», «échantillon composite de 24 h, avec prélèvement de sous-échantillons à toutes les heures»).
- Personne ayant prélevé l'échantillon.
- Indication si l'échantillon a gelé (en tout ou en partie) pendant le transport.

### *8.1.2 Installations et conditions de l'essai*

- Type et méthode d'essai (p. ex., «essai à concentration unique», «mode opératoire prévu dans la méthode de référence SPE 1/RM/13»).

---

* Pour obtenir des détails, prière de communiquer avec un des bureaux énumérés à l'annexe.

- Indication de tout écart par rapport au mode opératoire prévu dans le présent document.
- Nom du laboratoire d'essai et ville où il se trouve.
- Espèce d'organisme soumis à l'essai.
- Date et heure de mise en route de l'essai définitif.
- Personnes ayant mené l'essai et vérifié les résultats.
- pH, température, teneur en oxygène dissous et conductivité de l'effluent non dilué et non corrigé, juste avant la préparation des solutions d'essai.
- Renseignements sur toute aération des solutions d'essai avant l'introduction des poissons (débit, durée). Méthode et débit d'aération pendant l'essai.
- Concentration et volume des solutions d'essai, y compris les solutions de contrôle, et mention de l'usage de répétitions, s'il y a lieu.
- Mesures de la teneur en oxygène dissous, du pH, de la température et de la conductivité de chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) effectuées pendant l'essai.
- Nombre de poissons par solution d'essai. Poids frais moyen (± l'écart type) et densité de chargement (g/L) des poissons.

### *8.1.3 Résultats*

- Nombre de poissons morts dans chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) après 96 h. Nombre de poissons témoins laissant apparaître un comportement atypique ou stressé.
- Pour les essais à concentrations multiples, $CL_{50}$ et limites de confiance à 95 % calculées par ordinateur. Indication de la méthode statistique utilisée (p. ex., «probabilité logarithmique», «moyenne mobile»).
- Dernière valeur de la $CL_{50}$ à 96 h (et de ses limites de confiance à 95 %) calculée pour le ou les produits toxiques de référence. Produit(s) en cause. Date de mise en route de l'essai. Moyenne géométrique des $CL_{50}$ calculées antérieurement et limites de contrôle (± 2 fois l'écart type).

## *8.2 Données à verser au dossier**

### *8.2.1 Effluent*

- Description détaillée du lieu de prélèvement, de la source et du type d'effluent.
- Type de contenant(s) et d'étiquette ou de code utilisés.
- Volume ou poids de l'échantillon, ou les deux.
- Conditions de transport et de stockage (température, durée).

---

* Ces données doivent être conservées pendant cinq ans à l'installation d'essai, dans les bureaux du responsable des rejets ou à ces deux endroits. Certaines d'entre elles peuvent s'appliquer à une série d'essais et être consignées et conservées dans un rapport général.

- Apparence et autres propriétés (observations sur la couleur, la turbidité, l'odeur et la présence de solides flottants ou décantables).

- Modification de la couleur, précipitation, floculation, rejet de substances volatiles et autres modifications survenues pendant la préparation des solutions d'essai.

- Mode opératoire et résultats de toute analyse chimique (p. ex., teneur en solides en suspension, dureté).

### *8.2.2 Installations et conditions de l'essai*

- Adresse du laboratoire d'essai.

- Description des installations d'élevage ou d'acclimatation et d'essai, y compris leur agencement général et leurs moyens d'isolation.

- Conditions normales de détention et d'acclimatation : contenants, emplacement, éclairement, températures (y compris le taux maximal de modification), aération, volume et débit de l'eau, méthodes de renouvellement de l'eau, nombre et densité des poissons, méthodes de manipulation, type de nourriture, ration et fréquence de l'alimentation, incidence et traitement éventuel de maladies, pourcentage hebdomadaire de mortalité.

- Source des poissons soumis à l'essai.

- Bref résumé des conditions et modes opératoires propres à l'essai en ce qui touche la détention et l'acclimatation des poissons, s'ils diffèrent de la pratique courante; p. ex., durée, source et caractéristiques de l'eau employée (telles que la température, le pH et la teneur en oxygène dissous), type de nourriture et ration, incidence et traitement de maladies, pourcentage hebdomadaire de mortalité.

- Description de la source de l'eau utilisée pour l'élevage et l'acclimatation des poissons et comme eau de contrôle/de dilution.

- Prétraitement de l'eau d'acclimatation/de contrôle/de dilution, le cas échéant (p. ex., correction de la température, débit et durée de l'aération, quantité de tout produit chimique ajouté).

- Mesures (moyennes et intervalles) de la qualité de l'eau d'acclimatation/de contrôle/de dilution effectuées sur l'approvisionnement en eau et dans les bassins de détention. Renseignements à fournir : dureté, pH, conductivité, teneur en oxygène dissous et chlore résiduel total (s'il s'agit d'eau fournie par une municipalité). Renseignements à ajouter de préférence : gaz totaux dissous, alcalinité, solides, carbone organique, couleur, ions minéraux, métaux, ammoniac, nitrites et pesticides organophosphorés.

- Systèmes de réglage de l'éclairement et de la température.

- Source d'éclairement, photopériode et mesures antérieures de l'éclairement dans les bassins d'élevage ou d'acclimatation et à la surface des réservoirs d'essai.

- Description des réservoirs d'essai (dimension, forme et matériau), des couvercles, des paniers (si on en utilise pour inspecter les poissons) et de leurs méthodes courantes de nettoyage.

- Conditions et appareils d'aération des solutions d'essai.

- Longueur à la fourche et poids frais des poissons soumis à l'essai (moyennes et écarts types, exemples).

- Apparence des solutions; toute modification survenue pendant l'essai.

- Concentrations d'essai des produits toxiques de référence, tant nominales que mesurées. Indication de l'ensemble de données utilisé pour estimer la $CL_{50}$.

- Toute mesure de la qualité de l'eau des solutions d'essai non consignée au procès-verbal (section 8.1.2).

### *8.2.3 Résultats*

- Observations du nombre de poissons morts non consignées au procès-verbal (section 8.1.3) (p. ex., à 24, 48 et 72 h).

- Observations du comportement et l'apparence des poissons dans chaque solution d'essai faites au cours de l'essai.

- Confirmation de la vérification par représentation graphique de toute $CL_{50}$ produite par ordinateur.

# Références


APHA (*American Public Health Association*) *et al.* «Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms». *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17e éd. Washington, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, 1989. Part 8000, p. 8-1 - 8-143.

ASTM (*American Society for Testing and Materials*). «Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians». Report E729-80. Philadelphie, ASTM, 1980. 25 p.

BHSC (*British Health and Safety Commission*). «Methods for the Determination of Ecotoxicity. Approved Code of Practice». *Notification of New Substances Regulations, 1982.* Report COP 8. Londres, BHSC, 1982. 13 p.

Craig, G.R., K. Flood, J. Lee et M. Thomson. «Protocol to Determine the Acute Lethality of Liquid Effluents to Fish». Rexdale, ministère de l'Environnement de l'Ontario, juillet 1983. 9 p.

Environnement Canada, Conservation et Protection. *Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel*. Rapport SPE 1/RM/9. Ottawa, 1990. (1990a)

Environnement Canada. Projet de règlement sur les effluents des usines de pâtes et papiers. Ottawa, 1990. (1990b)

Environnement Canada, Conservation et Protection. *Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence*. Rapport SPE 1/RM/12. Ottawa, 1990. (1990c)

EPA (*Environmental Protection Agency*). «Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms». EPA/600/4-85-013. W.H. Peltier et C.I. Weber (éd.). Cincinnati, EPA, 1985. 215 p. (1985a)

EPA. «Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. Standard Evaluation Procedure». EPA-540/9-85-006. Washington, EPA, Hazard Evaluation Division, 1985. 12 p. (1985b)

Leitritz, E. et R.C. Lewis. «Trout and Salmon Culture (Hatchery Methods)». California Fish Bulletin No. 164. University of California, 1976. 197 p.

McGuinness, E.J. «Procedures Manual, Aquatic Bioassay Service Projects». Report AEVC-82M1. Vegreville, Alberta Environmental Centre, 1982. 56 p.

Mount, D.I. et L. Anderson-Carnahan. «Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures». Report EPA-600/3-88/034. Duluth, MN, EPA, 1988.

OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.* Paris, 1984.

Ontario. «Protocol for Single Concentration Acute Lethality Tests on Liquid Effluent Samples Using Rainbow Trout». Rexdale (Ontario), ministère de l'Environnement de l'Ontario, juin 1989. 10 p.

Rocchini, R.J., M.J.R. Clark, A.J. Jordan, S. Horvath, D.J. McLeay, J.A. Servizi, A. Sholund, H.J. Singleton, R.G. Watts et R.H. Young. «Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish». Victoria, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, 1982. 18 p.

SPE (Service de la protection de l'environnement). *Règlements sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers*. Rapport EPS 1-WP-72-1. Ottawa, 1971.

SPE. *Règles d'emploi et d'admissibilité des dispersants pour traiter les nappes de pétrole*. Rapport SPE 1-DIU-73-1. Ottawa, 1973.

SPE. *Règlement et directives sur les effluents des raffineries de pétrole*. Rapport EPS 1-WP-74-1. Ottawa, 1974.

SPE. *Règlements et directives sur les effluents liquides des mines de métaux*. Rapport EPS 1-WP-77-1. Ottawa, 1977. (1977a)

SPE. *Règlement et directives sur les effluents liquides de l'industrie de la viande et de la volaille*. Rapport EPS 1-WP-77-2. Ottawa, 1977. (1977b)

SPE. *Règlement et lignes directrices sur les effluents des établissements de transformation de la pomme de terre*. Rapport EPS 1-WP-77-4. Ottawa, 1977. (1977c)

SPE. *Méthode normalisée de contrôle de la toxicité aiguë des effluents*. Rapport EPS 1-WP-80-1. Ottawa, 1980.

SPE. *Lignes directrices concernant l'homologation des dispersants et leur utilisation pour traiter les nappes de pétrole*. 2e éd. Rapport SPE 1-EP-84-1F. Ottawa, 1984.

Stephan, C.E. «Methods for Calculating an $LC_{50}$». *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. F.L. Mayer et J.L. Hamelink (éd.). ASTM STP 634. Philadelphie, ASTM, 1977, p. 65-84.

UKWRC (*United Kingdom Water Research Centre*). «Acute Toxicity to Fish. Determination of the 96-hour $LC_{50}$ of Test Substances to the Rainbow Trout Under Flow-through Conditions». Standard Operating Procedure No. EP 120 02. Medmenham (R.-U.), UKWRC, 1983. 19 p.

*Annexe*

# Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique*

***Gouvernement fédéral*****

P. Wells (président actuel)
PE, Dartmouth (N.-É.)

B. Moores
St. John's (T.-N.)

K. Doe
Dartmouth (N.-É.)

W. Parker
Dartmouth (N.-É.)

N. Bermingham
Longueuil (Québec)

C. Blaise
Longueuil (Québec)

G. Elliott
Edmonton (Alberta)

R. Watts
North Vancouver (C.-B.)

K. Day
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

B. Dutka
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

C. Kriz
Direction des programmes fédéraux
Ottawa (Ontario)

D. MacGregor
Direction des produits chimiques commerciaux
Ottawa (Ontario)

P. MacQuarrie
Direction des produits chimiques commerciaux
Ottawa (Ontario)

R. Scroggins
Direction des programmes industriels
Ottawa (Ontario)

G. Sergy
Direction du développement technologique
Edmonton (Alberta)

P. Farrington
Direction de la qualité des eaux
Ottawa (Ontario)

***Gouvernements provinciaux***

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Sainte-Foy (Québec)

G. Westlake
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

W. Young
Ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique du Manitoba
Winnipeg (Manitoba)

K. Lauten
Ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique de la Saskatchewan
Regina (Saskatchewan)

J. Somers
Ministère de l'Environnement de l'Alberta
Vegreville (Alberta)

S. Horvath
Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique
Vancouver (C.-B.)

G. van Aggelen
Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique
North Vancouver (C.-B.)

---

* Au mois de juillet 1990.

** Environnement Canada, Conservation et Protection.

# Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection

**Administration centrale**
351, boulevard Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Hull (Québec)
K1A 0H3

**Région de l'Ontario**
25, avenue St. Clair est, 6e étage
Toronto (Ontario)
M4T 1M2

**Région de l'Atlantique**
15e étage, Queen Square
45, promenade Alderney
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

**Région de l'Ouest et du Nord**
Twin Atria nº 2, pièce 210
4999, 98e avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

**Région du Québec**
1141, route de l'Église
C.P. 10100
Sainte-Foy (Québec)
G1V 4H5

**Région du Pacifique et du Yukon***
224, rue Esplanade ouest
North Vancouver (C.-B.)
V7M 3H7

---

* Un programme informatique en BASIC pour le calcul de la $CL_{50}$ existe et peut être reproduit sur une disquette formatée de 13 cm compatible IBM, fournie par l'utilisateur. Pour se procurer ce programme, communiquer avec le Laboratoire de toxicité aquatique à cette adresse.